

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS**

PATRÍCIA DE LOURDES CARDOSO REZENDE

**Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* na América
Latina: antígenos e ensaios vacinais analisados por uma revisão
sistemática**

Florianópolis-SC
2016

PATRÍCIA DE LOURDES CARDOSO REZENDE

Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* na América Latina: antígenos e ensaios vacinais analisados por uma revisão sistemática

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Área de concentração: Agroecologia

Orientador: Prof. Phd Ademir Antonio Cazella

Coorientadora: Prof.^a Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

Florianópolis-SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rezende, Patrícia de Lourdes Cardoso
Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* na
América Latina: antígenos e ensaios vacinais analisados por
uma revisão sistemática / Patrícia de Lourdes Cardoso
Rezende ; orientador, Ademir Antonio Cazella ;
coorientadora, Lígia Miranda Ferreira Borges. -
Florianópolis, SC, 2016.
94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Agroecossistemas.

Inclui referências

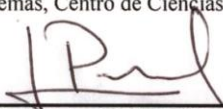
1. Agroecossistemas. 2. Agroecossistemas. 3.
Parasitologia veterinária. 4. Imunovacinologia
veterinária. 5. Revisão sistemática. I. Cazella, Ademir
Antonio . II. Borges, Lígia Miranda Ferreira . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

*“Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* na América Latina: antígenos e ensaios vacinais analisados por uma revisão sistemática”*

Por

**PATRÍCIA DE LOURDES CARDOSO
REZENDE**

Dissertação julgada adequada, em 24 de Agosto de 2016, e aprovada em sua forma fina, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora para obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas. Área de Concentração Agroecologia, no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias/UFSC.

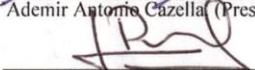


Prof. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho (Coordenador do Programa)

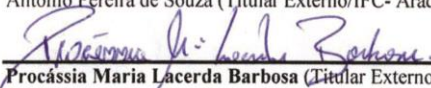
Banca Examinadora:



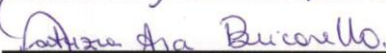
Ademir Antonio Cazella (Presidente /Orientador)



Antonio Pereira de Souza (Titular Externo/IFC- Araquari)



Procássia Maria Lacerda Barbosa (Titular Externo/ZDR/ UFSC)



Patrícia Ana Bricarello (Titular Interno/ZDR/ UFSC)

Candidata ao título:



PATRÍCIA DE LOURDES CARDOSO REZENDE

Florianópolis, 24 de Agosto de 2016

Ao meu pai José, à minha mãe Oneralda e aos meus irmãos Renato e Rejane, únicos no saber tocar meu coração, por serem exemplos e fazerem tão bem por isso,

AGRADEÇO e DEDICO

Aos meus familiares e amigos pelas orações, incentivo a ser forte e a ter constância.

Pelo bem que me fizeram, meu coração os guardará sempre

AGRADECIDO

À Gecy, Jean Ortega, Francisca Marta, Simone, Ester, Hisley, Neise, Marisnal, Pe. Arlon, Pe. Antônio Xavier e Pe. Eduardo Zanon, pela atenção, profissionalismo, amizade, fidelidade e orações; e por terem sido de inestimável valor nesta jornada,

AGRADEÇO IMENSAMENTE PELOS DONS OFERTADOS

Aos docentes e profissionais do PGA, sou muito grata

Aos orientadores, Prof. Dr. Ademir Antonio Cazella e Profª. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges, pela grandeza de espírito e graciosidade ao aceitarem e permitirem que uma contribuição tão pequena tornasse possível,

AGRADEÇO ESPECIALMENTE

A DEUS, de onde procedem e para onde findam todas as coisas,

AGRADEÇO e OFERTO

*O homem faz seus projetos, mas a
resposta vem de Deus.
(Provérbios 16, 1)*

RESUMO

REZENDE, P. L. C. Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* na América Latina: antígenos e ensaios vacinais analisados por uma revisão sistemática. 2016. 94 f. [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis- SC: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* está amplamente distribuído na América Latina e causa danos à saúde animal, prejuízos econômicos à pecuária bovina bem como danos ambientais. A imunovacinologia tem sido empregada como alternativa ao uso de produtos químicos em programas de controle integrado e obtido sucesso em países da América Latina. No entanto, pesquisas com antígenos que sejam capazes de controlar estirpes sobre as quais a ação da proteína Bm86 não obtenha eficácia, têm sido realizadas. O objetivo dessa revisão sistemática foi analisar diferenças entre antígenos, bem como fatores em ensaios de desafio, que possam ter sido determinantes para eficácia no controle do carrapato *R. microplus*, na América Latina. Foram analisados e incluídos apenas estudos que atenderam os critérios: (i) ensaios randomizados que estudaram antígenos candidatos para controle de estirpes de *R. microplus* da América Latina, e realizados nesta área, sendo teste desafio em animais de laboratório, com avaliação da eficácia do antígeno sobre, ao menos, dois parâmetros biológicos e realizados de 1994 a 2015; (ii) informação do grau de sangue e idade dos bovinos avaliados; e (iii) no mínimo três animais por grupo do experimento. Na estratégia de busca foram utilizadas três bases de dados eletrônicos: PubMed, Web of Science e CAB. Tanto a estratégia de busca quanto o método de análise se amparam na proposta do Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, porém, para a discussão priorizou-se os critérios do guia do Centre for Reviews and Dissemination - CRD. A busca encontrou 3.883 referências, das quais foram selecionados 13 estudos. Os antígenos contidos nos ensaios/estudos incluídos são ocultos. Esses estudos, após a avaliação da qualidade metodológica, apresentaram moderado a alto risco de viés. Além do risco de viés, a variabilidade na forma de conduzir os ensaios, bem como ausência de réplicas amostrais levaram a apenas uma avaliação de efeito, a qual indicou se a prática de vacinação sobre o controle do carrapato é benéfica; tal hipótese foi confirmada pela meta-análise, pois a medida de efeito resumo, estimada por regressão (EVR),

foi maior do que zero. A meta-análise detectou diferenças entre os estudos, porém não foi possível indicar o melhor antígeno, pois para isso, deveria haver mais réplicas de diferentes antígenos sobre uma mesma estirpe e de um mesmo antígeno sobre diferentes estirpes, sob condições experimentais similares. Sob essa ótica, a revisão sistemática abriu caminhos para avaliações futuras com meta-análise, caso se invistam em maior padronização de ensaios e haja réplicas de estudos de antígenos vacinais sobre estirpes específicas. Nos três países, Brasil, Cuba e México, houve pelo menos um antígeno, de uma estirpe nativa, com eficácia acima de 60% (mediana) dentre os estudos da presente revisão, entre os anos de 2002 e 2015. Adicionalmente, não existem critérios padronizados para classificar antígenos altamente eficazes. Por isso foi possível apenas comparações de antígenos com potenciais pouco ou muito pouco específicos de antigenicidade, porém, apesar disso, elas permitiram, pelas evidências encontradas, selecionar os antígenos que se apresentaram, potencialmente, mais promissores, tais como: RmFER2 e RmAQP1, SBm7462, SUB-MSP1a, pPO, Bm95 e rBrRm-MP4.

Palavras-chave: Vacina. *Rhipicephalus microplus*. Carrapato. Revisão sistemática. Meta-análise.

ABSTRACT

REZENDE, P. L. C. Control of *Rhipicephalus microplus* tick in Latin America: antigens and vaccine trials analyzed by a systematic review. 2016. 94 f. [Masters science]. Florianópolis- SC: Agricultural Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, 2016.

The tick *Rhipicephalus microplus* is widely distributed in Latin America and causes veterinary, economic and environmental damage. The imunovacinologia has been used as an alternative to the use of chemicals in integrated control programs and been successful in countries of Latin America. However, research with antigens that are able to control the strains on which the action of protein Bm86 not get effectiveness have been performed. The purpose of this systematic review was to identify differences between antigens, as well as factors in testing challenge, which may have been decisive for the efficacy of the control *R. microplus* in Latin America. Were identified and included only studies that presented the criteria: (i) randomized trials that studied candidate antigens for control of strains of *R. microplus* in Latin America, and in this field, and challenge testing in laboratory animals, with evaluation of the efficacy of antigen on at least two biological parameters and performed from 1994 to 2015; (ii) race information and age of the evaluated cattle; and (iii) a minimum of three animals per experimental group. In strategy of busca, was selected three electronic databases: PubMed, Web of Science and CAB. Were included only articles in English, because were not found in Spanish or Portuguese. Both the search strategy and the analysis method were supported by proposed Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, however, to discuss prioritized the criteria of CRD guide. The search was conducted from November to December 2015 and were selected 13 studies, of the total of 3,883 references found. All antigens contained in the tests / studies are concealed. These studies, after the evaluation of methodological quality, were classified as moderate to high risk of bias. In addition to the displayed bias risk, the variability in how to conduct the tests, and there was no sample replicates (studies), took just over an effect evaluation, which indicated if the practice of vaccination on tick control is beneficial; this hypothesis was confirmed by the meta-analysis as the summary measure of effect, estimated by regression (EVR) was greater than zero. For the meta-analysis were found differences between the studies, but it was not possible to indicate the best antigen for therefore, there should be more replicas of different

antigens on the same strain and the same antigen on different strains under similar experimental conductions. Under this view, the systematic review paved the way for future evaluations with meta-analysis, if to invest in greater standardization of tests and replicas of studies on vaccine antigens on specific strains. In Brazil, Cuba and Mexico, there was at least one antigen, of native strain, effectively above 60% (median) among the studies of this review, between 2002 and 2015. Additionally, there are no standardized criteria to rank highly effective antigens. And so it was only possible antigens comparisons with potentially little or very little specific antigenicity, but nevertheless they allowed, the evidence found, select the antigens that showed potentially more promising, such as RmFER2 and RmAQP1, SBm7462, SUB-MSP1a, pPO, Bm95 and rBrRm-MP4.

Keywords: Vaccine. *Rhipicephalus microplus*. Tick. Systematic Review. Meta-analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quantidade de artigos incluídos na revisão sistemática segundo revista e ano de publicação.....	40
Figura 2 – Características apresentadas pelos 13 estudos, após avaliação da qualidade metodológica, para a alocação dos bovinos testados.....	58
Figura 3 – Características apresentadas pelos 13 estudos, após avaliação da qualidade metodológica, para critérios de condução de ensaios experimentais.....	59
Figura 4 – Avaliação do efeito da vacinação anti <i>o R. microplus</i>	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características dos estudos incluídos.....	42
Quadro 2 – Variabilidade apresentada na condução experimental quanto ao tipo de alojamento, tipo de infestação, e na alocação dos animais quanto o grau de sangue, nos diferentes estudos incluídos.....	51
Quadro 3 – Diferenças estatísticas em relação às médias de pesos de teleóginas dos grupos controle e dos grupos de tratamento, após desafio com diferentes antígenos candidatos, nos estudos incluídos.....	52
Quadro 4 – Mecanismo de ação de anticorpos (Atcs) vacinais nos tecidos do carrapato, origem e função (ões) das proteínas/antígenos, conforme apresentado nos estudos incluídos.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das moléculas antigênicas e separação por classes de antígenos	45
Tabela 2 – Classificação da eficácia geral das moléculas segundo fórmula de cálculo empregada pelos estudos incluídos.....	47
Tabela 3 – Análise de sensibilidade para avaliar o impacto de diferentes valores de correlação entre os tamanhos de efeitos (ρ) sobre as estimativas do tamanho de efeito acumulado (g de Hedges), o erro-padrão do g e do T^2	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DO CARRAPATO RHIPICEPHALUS MICROPLUS.....	17
2.1 Incidência e ciclo de vida do carrapato nos rebanhos bovinos.....	17
2.2 Mecanismos de defesa na relação hospedeiro-parasito....	19
2.3 Parasitismo e complexo tristeza parasitária.....	22
2.4 Controle e resistência do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> a acaricidas químicos.....	23
3 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTI- RHIPICEPHALUS MICROPLUS.....	25
3.1 O uso de vacina comercial em estratégias de controle do carrapato em rebanhos bovinos da América do Sul.....	29
4 REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA.....	31
5 OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo geral.....	33
5.2 Objetivos específicos.....	33
6 MÉTODO.....	34
7 RESULTADOS.....	39
8 DISCUSSÃO.....	63
9 CONCLUSÕES.....	69
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICES.....	90

1 INTRODUÇÃO

Infestações por parasitos tem sido um problema primário para a produção de bovinos em regiões de clima tropical e subtropical. Dentre os ectoparasitos, os carrapatos têm maior destaque pelas perdas ocasionadas na produção e produtividade na bovinocultura de leite e de corte.

A espécie de carrapato *Rhipicephalus microplus* está amplamente distribuída pelo mundo, ocorre em áreas tropicais e subtropicais na Ásia, Austrália, África, Américas do Norte e do Sul (KESSLER; SCHENCK, 1998; PRUETT et al., 2008) e tem sido um grande desafio para o aumento da produção de gado, afetando cerca de 1,4 bilhões de cabeças em todo o mundo (FAO, 2011).

Anteriormente, essa espécie de carrapato era denominada *Boophilus microplus*, mas uma reclassificação feita por Murrell e Barker (2002), baseada em análises moleculares e morfológicas, o incluiu no gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, em vista de evidências da relação filogenética entre ambos. Novos estudos como os de Low et al. (2015) permitiram a descoberta de mais táxons dessa espécie, de modo que agora *R. microplus* é conhecido como um complexo de espécies com pelo menos cinco táxons: *R. australis*, *R. annulatus*, *R. microplus* clado A; *R. microplus* clado B; e o novo táxon, *R. microplus* clado C.

Porém, ainda que os estudos de classificação taxonômica permaneçam, esse é o principal ectoparasito que causa prejuízo à produção de bovinos. Estima-se que perdas econômicas, em potencial, causadas pelo *R. microplus*, anualmente, podem chegar a \$3,24 bilhões, de acordo com levantamento de Grisi et al. (2014).

Em vista disso, diversas medidas são empregadas na tentativa de controlar infestações, mas, até o momento, poucas têm demonstrado ser suficientemente eficazes na redução do uso de carrapaticidas ou do parasitismo a níveis aceitáveis. Um exemplo de sucesso, em meio a muitas tentativas de controle, foi o uso integrado de vacinas anticarrapato *R. microplus* com o manejo de pastagens em propriedades de Cuba e Austrália. Essas vacinas têm como antígeno a proteína Bm86, que em 1994, foram produzidas em escala industrial, GAVACTM de Havana, Cuba, e TickGARD, australiana (GUERRERO; MILLER; LEÓN, 2012).

Essa mesma proteína vacinal permitiu a redução do uso de acaricidas em 64%, em média, entre os anos de 1995 e 2007, predominantemente em Cuba e Colômbia, de acordo com de la Fuente e Kocan (2014). Mesmo com esse índice, as primeiras vacinas comerciais

compostas pela proteína Bm86, apresentaram resultados de eficácia bastante variáveis entre os países que as utilizaram. Por isso, a GAVAC, apesar de ainda ser comercializada nas Américas do Sul e Norte, não tem uma aceitação generalizada por parte dos produtores (GUERRERO; MILLER; LEÓN, 2012).

As primeiras experiências de controle, com uso de vacina anticarrapato, em bovinos, foram obtidas a partir da eficácia de um único tipo de antígeno (proteína Bm86), porém elas abriram os caminhos para descobertas de novas moléculas protetoras. Nessa perspectiva, um fator aliado é a insustentabilidade constatada dos métodos de controle tradicionais, baseados principalmente em acaricidas químicos, os quais provocam a seleção de carrapatos resistentes aos princípios ativos existentes (VAZ JUNIOR et al., 2012; DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015). Outro fator é a relação entre carrapatos e doenças por eles transmitidas, que é um problema crescente e afeta a saúde humana e animal em todo o mundo (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015) e impulsiona alternativas mais plausíveis para controle de parasito e organismos patogênicos numa mesma vacina (WILLADSEN, 1987, 1990, 2004; WIKEL, 1988; NUTTALL et al., 2006; SONENSHINE et al., 2006).

A literatura científica (DE LA FUENTE et al., 2007; PARIZI et al., 2009; RICHARDS et al., 2015) tem demonstrado que, se não foi possível obter vacinas eficazes até o momento, houve, no entanto, produção de uma grande quantidade de antígenos candidatos a vacina anticarrapato. Dessa forma, considerando essa variabilidade existente, pretende-se, com a presente revisão, analisar, para conhecer mais ampla e claramente, fatores relacionados a condução de ensaios de desafio e diferenças antigênicas que possam ter influenciado de forma mais determinante na eficácia vacinal contra a espécie de *R. microplus*; tomando-se como marco inicial, para o estudo, o ano de 1994, no qual deu-se início o uso comercial de vacinas para esse fim; além de considerar apenas antígenos originários da América Latina. Esta região foi escolhida, pois nesta área são encontradas diferentes estirpes de *R. microplus*. Tais diferenças foram constatadas inicialmente em estudos de desafio com a proteína Bm86 na Austrália, México, Cuba, Argentina e Venezuela, países nos quais houve uma tendência de se obter uma correlação inversa entre a eficácia vacinal e sequência no locus gênico dessa proteína (locus R250.7), encontrada no intestino do carrapato (GARCIA-GARCIA et al., 1999); isto é, quanto maior foi a eficácia, menor a variação da referida

sequência (expressa pelos carrapatos); indicando, assim, variações genéticas entre carrapatos dessas regiões estudadas.

Para se alcançar os objetivos da revisão levou-se em conta que os processos de identificação e caracterização de antígenos vacinais contra a espécie do carrapato em questão passam por ensaios de desafio em bovinos (AMARAL, 1993; MARITZ-OLIVIER et al., 2012; CUNHA et al., 2013; SCHETTERS et al., 2016), e, portanto, foram tomados como amostras e pontos de partida. A amostragem dos ensaios foi obtida via revisão sistemática de literatura, muito utilizada em pesquisas clínicas na medicina humana, mas que vem ganhando espaço em diferentes áreas do conhecimento. É um método que, basicamente, aplica maior rigidez na seleção da literatura segundo critérios estabelecidos e na avaliação dos estudos incluídos (amostra), para que sejam considerados somente aqueles que apresentem maior segurança para a revisão ou mesmo para aplicação de resultados (CASTRO, 1998).

Neste método, todos os estudos incluídos são avaliados quanto aos riscos de apresentarem vícios/viéses, que por sua vez são categorizados como de baixos, moderados ou altos (HIGGINS; GREEN, 2011).

Portanto, no âmbito desta revisão, buscou-se estudos relevantes que possam explicar ou indicar pontos determinantes na escolha de antígenos vacinais para o controle do carrapato do boi.

2 EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

2.1 Incidência e ciclo de vida do carrapato nos rebanhos bovinos

O bovino é um hospedeiro suscetível espécie de carrapato *R. microplus*, o que significa que esse parasito tem um bom desempenho alimentar e reprodutivo quando parasita estes animais. Essa característica conferiu uma ampla distribuição geográfica a essa espécie de carrapato, que apresenta forte impacto econômico negativo, sobretudo na América Latina e Austrália (PEREIRA et al., 2008).

Nos países da América Latina, mais especificamente ao Norte da Argentina até o México, exceto Chile, há ocorrência da espécie de carrapato *R. microplus* (PEREIRA et al., 2008); que se distribui entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul (WHARTON, 1974; KASAI et al., 2000; GONZÁLES, 2002). É um parasito depende de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, e apresenta duas fases complementares: a de vida livre e a de vida parasitária. A fase de vida livre sofre interferências do ambiente, principalmente as relacionadas à umidade e temperatura, as quais afetam os períodos de desenvolvimento. Por outro lado, a fase de vida parasitária quase não se altera nas regiões onde existem infestações (GONZALES, 2003).

A fase de vida livre inicia-se com a queda de fêmeas totalmente ingurgitadas (teleóginas), que realizam postura de cerca de 3.000 a 4.000 ovos, em aproximadamente, até duas semanas, se em condições ideais de temperatura (27 – 28°C) e umidade (80%). A produção de ovos também depende do grau de ingurgitamento, que pode chegar até cem vezes acima do peso pré-alimentação da fêmea (FURLONG, 2002; FRIESEN; KAUFMAN, 2009). O peso mínimo verificado, para uma fêmea da espécie *R. microplus* realizar postura de ovos foi de 17 mg e as melhores conversões em ovos se dá na faixa de 180-226 mg de peso (BENNETT, 1974). Em infestações experimentais realizadas em bovinos, o peso médio de postura das fêmeas foi de 111,52 mg (FURLONG, 1990) e 155,60 mg (GLÓRIA et al., 1993). Nessa dinâmica do ciclo biológico, após a postura, e quando a massa de ovos é grande, aqueles que estão na borda protegem os que ficam no interior da massa, mantendo, assim a umidade e diminuindo a proporção de ovos encarquilhados. Esse efeito de massa tem grande importância na população do carrapato do boi (ROCHA, 1984).

Os ovos permanecem no ambiente aproximadamente por 30 dias (GONZALES, 2003; FURLONG, 1993), e a média de incubação é de 22 dias (APANASKEVICH; OLIVER, 2014) em condições ótimas até a eclosão e liberação de larvas, que se tornam infectantes após três dias. Quando estas larvas eclodidas encontram o hospedeiro, finaliza-se a fase de vida livre (FURLONG, 1993). Já na fase parasitária, a infestação das larvas se dá pela fixação, normalmente, em locais de difícil acesso para autolimpeza do hospedeiro, como barbeta, peito, cauda e face posterior das coxas (ATHANASSOF, 1957). O períneo, escroto, prepúcio, úbere, região inguinal, abdome ventral, tórax, axilas, barbeta, tábua do pescoço, interior e atrás do pavilhão auricular são regiões anatômicas de grande ocorrência do *R. microplus* no hospedeiro bovino (PEREIRA et al., 2008).

De acordo com Riek (1965) as larvas após alcançarem o hospedeiro, movimentam-se sobre ele por uma hora ou mais até se fixarem e darem início a fase parasitária propriamente dita. Numa determinada população de bovinos, com o mesmo padrão racial, as larvas não se distribuem de forma uniforme. De 10 a 15% de hospedeiros num mesmo rebanho albergam em torno de 70% da população de parasitos, enquanto 85 a 90% dos outros hospedeiros carregam apenas 30% (WHARTON et al., 1970). Essa distribuição parece estar relacionada a resistência individual de cada bovino, segundo esses mesmos autores. Por isso, para reduzir a prevalência do parasito no rebanho, uma das estratégias, em programas de controle, é ter maior atenção ou até mesmo eliminar os animais pertencentes ao grupo menos resistente, 10 a 15%, do rebanho (PEREIRA et al., 2008). Essas larvas sofrem mudas após se fixarem no hospedeiro e passam a ser sexuadas; os machos, neandros, e as fêmeas neóginas. A fêmea, após fecundada, continua o repasto no animal até seu estágio máximo de ingurgitamento, recebendo a partir de então a denominação de teleógina (FARIAS, 1995). O macho, menor que a fêmea, permanece no hospedeiro após o desacoplamento e queda da teleógina, podendo fertilizar mais fêmeas e sobreviver duas vezes mais que elas (ROBERTS, 1968).

A sobrevivência do carrapato no ambiente depende de alguns fatores mais prevalentes que outros e que controlam naturalmente esse parasito. No Brasil, altas temperaturas e alta umidade relativa do ar durante a primavera e verão estão associadas com a diminuição da fase de vida livre. No outono e inverno, baixas temperaturas são associadas a uma maior sobrevivência das larvas, resultando na manutenção delas nas pastagens. Como resultado, pode haver três a quatro gerações anuais de carrapato (VAZ JUNIOR et al., 2012).

O Sul do Rio Grande do Sul, região que está situada próxima ao paralelo 32° S, é considerado área geográfica marginal de ocorrência da espécie *R. microplus*, pois as baixas temperaturas verificadas no período de junho a setembro dificultam a fase de vida livre do parasito (BRUM et al., 1985). Dessa forma, a reinfestação ocorre a partir de outubro, por larvas da progênie de fêmeas ingurgitadas desprendidas no final do período favorável, que tiveram seus períodos de pré-postura, postura e eclosão prolongados (GONZALES, 2003). Principalmente quando fatores relacionados à temperatura e à umidade relativa do ar são desfavoráveis, o número de larvas viáveis pode reduzir consideravelmente, e conseqüentemente, os índices de infestação dos bovinos (GONZALES, 1995). A temperatura exerce, assim, papel dominante na regulação e duração das fases de vida livre. Já a latitude influencia o fotoperíodo, que permite aos carrapatos a sincronização de suas atividades biológicas com as condições climáticas ótimas para seu desenvolvimento e manutenção no ambiente, segundo Brito et al. (2006).

2.2 Mecanismos de defesa na relação hospedeiro-parasito

Os carrapatos da família Ixodidae, como *R. microplus*, se alimentam principalmente, em grandes ruminantes (SONENSHINE; ROE, 2014), havendo maiores infestações nos bovinos de raças europeias que nos de raças zebuínas (GONZALEZ, 2003).

As interações imunológicas na interface hospedeiro-parasito envolvem defesa inata e adquirida do hospedeiro contra a infestação e a defesa imunomodulada pelo carrapato (WIKEL; BERGMAN, 1997).

Ao primeiro contato com o carrapato, a imunidade inata do hospedeiro bovino é acionada e consiste, principalmente, em resposta inflamatória e processos hemostáticos, como vasoconstrição, ativação de fatores de coagulação sanguínea e conseqüente agregação plaquetária (PEREIRA et al., 2008), como meio de dificultar e eliminar a fixação do parasito.

Nesse desafio pelo parasito, o hospedeiro desenvolve, além da defesa inata (mediada por macrófagos e células dendríticas, assim como por células fagocíticas) a resposta imune adaptativa (mediada por conjuntos de moléculas e células que conferem funções reguladoras e efetoras). Sendo que nos mecanismos de defesa, a imunidade inata estabelece o cenário para a resposta adaptativa e, tanto a inata quanto a adaptativa, tem que interagir vigorosamente (via de apresentação de antígeno-célula) para conferir imunidade protetora (ZEPP, 2010). Como

resultado, linfócitos T e B são desenvolvidos e mantêm a memória para proteção do hospedeiro em futuras espoliações (WIKEL, 1996).

Sabe-se que, para muitas doenças, a defesa do hospedeiro é mediada via resposta imune adaptativa, o que significa por anticorpos, citocinas, ou por resposta imune celular B e/ou T dependentes (ZEPP, 2010). Estudos de Opdebeeck et al. (1988) e Jackson e Opdebeeck (1990) identificaram evidências de que a imunidade protetora contra o carrapato, nos bovinos, era induzida. Esses pesquisadores indicaram que frações da membrana do tecido do intestino médio de *R. microplus* protegeram em aproximadamente 91% o gado contra ataque do carrapato, e que os níveis de IgG1 e anticorpos fixadores do complemento relacionaram-se aos níveis de proteção induzida por uma vacina, a qual continha essas frações.

Outras descobertas foram verificadas quanto à diferença de resposta imune entre raças de bovinos. Pesquisadores como de la Fuente et al. (2007) e Piper et al. (2009) demonstraram que, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, infestados com *R. microplus* apresentaram uma forte resposta imune adaptativa. A subespécie *B. t. indicus* apresentou uma forte resposta mediada por células T, enquanto que a *B. t. taurus* apresentou níveis elevados de moléculas inflamatórias, IgG1 e elevada expressão do gene MHC-II. Em conclusão, tornou-se evidente que uma resposta de células T adquirida é crítica para o desenvolvimento de IgG específico contra o carrapato e muito provavelmente para resistência do hospedeiro à infestação (PIPER et al., 2009). Assim, conforme esses autores, o reconhecimento de epítomos por células T, células B e anticorpos solúveis constitui a base da resposta imune. Esse estudo se refere aos componentes celulares e anticorpos da circulação periférica, os quais diferiram entre animais das raças Brahman e Holandesa, altamente divergentes em suas resistências contra o carrapato *R. microplus*.

No final da década de oitenta, Wikel e Whelen (1986) indicaram que a evidência da imunogenética bovina poderia ajudar a explicar as diferenças observadas na aquisição e expressão da resistência; deduzindo ser bem possível que a resistência inata refletiria nas diferenças dos genes de resposta imunológica em bovinos.

Mais tarde, alguns avanços foram observados para detectar genes ligados à resistência ao parasito como a descoberta do padrão de imunoglobulinas que participam da defesa quando o hospedeiro é desafiado com diferentes cargas parasitárias, descrito por Kashino et al. (2005). Nos resultados desse estudo constatou-se que altas infestações de carrapatos suprimiram a resposta de anticorpos IgG em raças sensíveis enquanto isso não aconteceu em raças resistentes, que os anticorpos de

IgE não são protetores, e que a dose de saliva do carrapato modulou o isótipo de respostas de anticorpos do hospedeiro.

Atualmente, tem-se identificado e quantificado mecanismos de resistência do hospedeiro e seus fatores de modulação, embora haja muito a ser explicado; além de haver informações conflitantes sobre o papel da imunidade humoral na resistência contra o carrapato, pois estudos recentes indicam que fortes respostas de IgG para antígenos do carrapato não são de proteção (JONSSON et al., 2014).

Em relação a supressão imunomodulada, o carrapato se vale de sua saliva, cujas atividades farmacológicas, presumivelmente, o ajudam a evadir respostas do hospedeiro, incluindo anticomplemento e respostas imunes inata e adaptativa. A caracterização destas atividades ganhou impulso nos últimos anos (JUNCADELLA; ANGUITA, 2009). As glândulas salivares de carrapatos são órgãos complexos e multifuncionais. Permitem que os carrapatos se alimentem de nutrientes concentrados do sangue, devolvendo excesso de água e íons via saliva para o hospedeiro. Além de produzirem um "coquetel" de moléculas para regular a secreção de proteínas salivares e modularem os mecanismos de defesa do hospedeiro (RIBEIRO; FRANCISCETTI, 2003; VALENZUELA, 2004; FRANCISCETTI et al., 2009).

Após a fixação ao hospedeiro, o carrapato expressa uma série de novos genes e síntese de proteínas na glândula salivar, que refletem os estágios do processo de alimentação. No pico de alimentação essa glândula aumenta 25 vezes de seu tamanho original e em seu teor de proteínas (KAZIMÍROVÁ, 2008).

São relativamente recentes a identificação molecular e a caracterização de componentes da saliva dos carrapatos com funções anticomplemento e anticoagulantes. Diversas proteínas com essas atividades são fundamentais para manutenção da fixação, alimentação e sobrevivência do parasito sobre o hospedeiro (TITUS et al., 2006). Os melhores estudos de identificação de proteínas supressoras se referem a Salp15, que se liga especificamente à célula T, correceptora de CD4+, resultando na repressão específica da ativação das células T CD4+ (JUNCADELLA; ANGUITA, 2009). Os linfócitos T são importantes células para a resposta imune celular e humoral. As células T CD4+ podem se diferenciar em Th1, que estimulado por interferons, ativa macrófagos e a produção de imunoglobulinas IgG para defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares (ABBAS et al., 2011); e essa resposta ocorre quando há presença de prostaglandinas da saliva do *R. microplus* (BOWMAN et al., 1996; TURNI et al., 2002). Conforme

estudos de Juncadella e Anguita (2009), a proteína Salp15 foi encontrada na saliva das espécies de carrapato *L. scapularis* e *L. ricinus*.

Dentre os mecanismos de evasão dos carrapatos através da modulação da resposta imunológica, sugere-se um “seqüestro” de imunoglobulinas IgG do hospedeiro, que alcançam e saem do intestino do carrapato, após repasto, e chegam às glândulas salivares do parasito. As IgG's são secretadas junto com a saliva do carrapato durante a alimentação do parasito (WANG e NUTTALL, 1994), driblando, dessa forma a defesa do hospedeiro.

Outra importante defesa do carrapato *R. microplus* é a evasão do sistema hemostático do hospedeiro através de uma complexa gama de proteínas secretadas na saliva. Inibidores de serina-protease (serpinas) são importantes componentes da saliva que representam uma grande gama de inibidores de protease em Ixodídeos. As serpinas RMS-19 e RMS-20 foram expressas em todos os tecidos de *R. microplus*; e dentre as 18 serpinas estudadas na pesquisa (encontradas em estirpes dos EUA, Brasil e Austrália), a RMS-15 inibiu especificamente a protease trombina, importante para coagulação sanguínea (RODRIGUEZ-VALLE et al., 2015). Outras duas proteases desse carrapato e que quebram a principal serina protease (trombina) foram identificadas anteriormente: a BmAP descoberta por Horn et al. (2000) e a microfilim por Ciprand et al. (2006).

Os estudos da atividade, mecanismos de ação e características dos compostos da glândula salivar do carrapato identificam a interação entre esses parasitos e seus hospedeiros e muitas vezes podem conduzir à descoberta de novos alvos de vacinas contra os carrapatos (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999; MARITZ-OLIVIER et al., 2007; HOVIUS et al., 2008). Adicionalmente, tecnologias transcriptômicas (relativa a expressão gênica completa de parte ou totalidade de um organismo/órgão/tecido/célula via RNA) tem sido particularmente valiosas em proporcionar um caminho relativamente rápido para adquirir informações de análises comparativas de diferentes tecidos do carrapato, células e até mesmo estágios de desenvolvimento (VAN ZEE et al., 2007).

2.3 Parasitismo e complexo tristeza parasitária

Existem, no Brasil, duas espécies causadoras da tristeza parasitária bovina (TPB), que são protozoários do gênero *Babesia* das espécies *B. bovis* e *bigemina*, e para estes o carrapato *R. microplus* é o único vetor (SAUERESSIG, 1995). A anaplasmosse também faz parte do complexo

TPB e é causada pela rickettsia *Anaplasma marginale*, porém, para este agente há mais de um vetor além do *R. microplus* (FARIAS, 1995, 2001).

A TPB é amplamente disseminada e afeta aproximadamente 80% da população bovina do mundo, com maior prevalência e importância para a saúde em regiões tropicais e subtropicais (FAO, 2011). Além da depressão da função imunitária devida a esses patógenos, há perda de sangue, estresse geral, irritação, levando a uma diminuição da produtividade de leite e carne (DE CASTRO, 1997; MAPHOLI, 2014). No Brasil, as perdas estimadas por causa da TPB aproximaram a US\$ 2 bilhões por ano (DE CASTRO, 1997).

A estimativa de perda em vacas leiteiras, mestiças de Holandês-Zebu, infestadas por uma média de 105 carrapatos é de uma redução em 23% da produção de leite / dia; assim, perdendo cerca de ¼ da renda através do leite, gera-se significativo impacto no sistema produtivo, sem contar as perdas se houver TPB, que serão muito maiores e muito difíceis de serem mensuradas isoladamente (FURLONG et al., 1996; SUDHAKAR, 2013). Além disso, o efeito direto da infestação por carrapatos para a indústria da carne e do couro são bem mais significativos. Animais com uma média de 40 carrapatos / dia podem perder até 20 kg / ano acarretando a queda do valor do couro em 20% a 30% (FRISCH, 2000).

2.4 Controle e resistência do carrapato *Rhipicephalus microplus* a acaricidas químicos

O controle do carrapato gera desequilíbrio do agroecossistema e se materializa em diferentes processos que se estabelecem na unidade de produção. Esses processos são: o aparecimento de cepas ou populações de carrapatos resistentes a carrapaticidas utilizados para seu controle; as perdas econômicas por danos na pele, diminuição nos índices de ganho de peso, taxa de prenhes ou natalidade. São todos associados a infestação e aumento nos custos por uso de tratamentos de controle do parasito (POLANCO-ECHEVERRY; RÍOS-OSORIO, 2016).

Além de outros métodos disponíveis utilizados, o químico é, de longe, o mais utilizado para o controle de carrapatos em rebanhos bovinos; fato que leva a crescente número de populações resistentes desses ácaros a diversos princípios ativos presentes nos acaricidas comercializados (ANDREOTTI, 2010; GOMES et al., 2011). Apesar de ser ainda a forma mais eficaz para superar essas infestações parasitárias, tem sido cada vez menos eficiente (GOMES et al., 2011).

A definição formal de resistência é uma mudança na susceptibilidade das espécies alvo para uma droga (SANGSTER, 2001; CORLEY et al., 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1965), resistência em termos gerais, é “a capacidade de uma cepa do parasito para sobreviver e / ou multiplicar apesar da administração e absorção de um medicamento administrado em doses iguais ou superiores aos normalmente recomendados, mas dentro dos limites de tolerância do sujeito ”.

Os principais fatores relacionados ao desenvolvimento a resistência são biológicos, operacionais e genéticos (ABBAS et al., 2014). As bases moleculares da resistência em *R. microplus* não são totalmente conhecidas, mas estudos indicam alguns mecanismos associados (ANDREOTTI, 2010). Nesse sentido, o aumento de expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas envolvidas em metabolismos detoxificadores; mutações em neurorreceptores; e mutações em canais de sódio são algumas explicações para o desenvolvimento de resistência (MARTIN et al., 2003; OAKESHOTT et al., 2003). De acordo com uma revisão de Abbas et al. (2014), foram encontrados três tipos de resistência: (1) resistência adquirida, (2) resistência cruzada e (3) resistência múltipla. O significado de cada tipo é basicamente autoexplicativo e foi referenciado por esses autores como: (1) resulta da diminuição hereditária em se ter sensibilidade a fármacos com o passar do tempo, (2) é o compartilhamento de resistência entre os diferentes acaricidas com um modo de ação semelhante, (3) é uma resistência de mais do que uma droga, mesmo que tenham diferentes modos de ação.

É importante salientar que uma vez instalada a resistência em uma população de carrapatos a determinado princípio ativo, essa resistência será também instalada para os outros produtos da mesma família ou grupo químico de forma irreversível para o rebanho, inviabilizando o seu uso para gerações futuras, exceto para o grupo das amidinas, que, após alguns anos sem uso, obtém a reversão da resistência, com nova possibilidade de uso no mesmo rebanho (FURLONG, 2005; FURLONG et al., 2007).

Em uma revisão, Merlini e Ymamura (1999) relataram resistência da espécie *R. microplus* a carrapaticidas, em alguns países, a quase todas as bases químicas até então usadas. A correspondência entre os países relatados e resistência aos carrapaticidas foi dada da seguinte forma: arsenicais (Brasil, Austrália, Argentina, Uruguai), piretróides (Austrália, Brasil, Argentina), organofosforados (Austrália, Brasil e Argentina), amidinas (Austrália, Brasil), organoclorados (Brasil). Adicionalmente foram identificadas outras bases responsáveis pelo desenvolvimento de

resistência desse parasito, tais como: ivermectina (México), avermectina (Brasil), deltametrina (Brasil, Colômbia, México), formaldeídos (Brasil, Colômbia, México), dentre várias outras (ABBAS et al., 2014).

No Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, foi documentado o primeiro caso de resistência de *R. microplus* a fluazuron, pertencente à primeira população de carrapatos resistentes a seis classes de acaricida, a cepa Jaguar. Este estudo demonstrou a necessidade de mais pesquisas para estabelecer uma estratégia integrada que inclui o controle químico e o desenvolvimento de ferramentas de controle alternativas (RECK et al., 2014). Nesse sentido a vacinação anticarrapato aparece como uma alternativa promissora e eficaz de controle para minimizar os danos causados pelos carrapaticidas químicos e outros métodos de controle pouco sustentáveis (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015).

3 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTI-*RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

A investigação de antígenos para o controle imunológico de carrapatos, como uma alternativa para as limitações dos métodos convencionais, tem sido desenvolvida desde a década de 1980 (JOHNSTON et al., 1986; WILLADSEN, 1987; WILLADESEN; KEMP, 1988). Apesar do tempo de pesquisa, os antígenos estudados não têm demonstrado efeito de vacinas clássicas ou um efeito “knockdown” como os acaricidas químicos (RODRÍGUEZ-MALLON, 2016).

O desenvolvimento de vacinas contra carrapatos demanda identificação do antígeno candidato, expressão de proteína, purificação, e em seguida, caracterização e ensaios para avaliação de suas funções. A imunidade do hospedeiro desencadeada por um potencial antígeno exige avaliação, e se a exposição induzir uma série de respostas de proteção, a eficácia do antígeno, no carrapato, é testada (DE LA FUENTE; KOCAN, 2006; FANG; PUNG, 2011; MARITZ-OLIVIER et al., 2012; SCHETTERS et al., 2016).

Nesses testes, se avalia o efeito dos anticorpos vacinais sobre a biologia do carrapato, bem como a relação do nível de título de anticorpos nos hospedeiros sobre a fisiologia do parasito, durante o desafio, de acordo com Cobon et al. (1995) e de la Fuente et al. (1998). Considerando tal relação, Lodos et al. (2000) propuseram um modelo de avaliação de efeito da vacina contra carrapato, que considerava a titulação de anticorpos em bovinos durante todo o tempo de existência de qualquer estágio de infestação do parasito no hospedeiro. Neste modelo

consideraram (i) nível de título de anticorpos após a vacinação, (ii) efeitos/danos vacinais por estágio do parasito, e (iii) o efeito/dano acumulados sobre todos os estágios de desenvolvimento do carrapato.

Em geral, dois tipos distintos de alvo antigênico têm sido explorados e testados em seus efeitos sobre o carrapato para o desenvolvimento de vacinas protetoras. Inicialmente, previa-se e idealizava-se a vacinação de bovinos contra o *R. microplus* com o uso de antígenos salivares desse parasito, que normalmente provocavam respostas imunitárias protetoras no hospedeiro. As tentativas iniciais foram frustradas e a explicação, em parte, pode ser pela ação imunoevasiva, em vista de componentes da saliva do parasito, bem como pela dificuldade de se encontrar uma forma de estimular resposta imunológica adequada no hospedeiro. Alternativamente e pela primeira vez foi sugerida por Galun (1978) a utilização de antígenos internos (ocultos) como meta de acionar resposta imunitária no hospedeiro; após entender que componentes do sistema imune bovino, quando ingeridos pelo carrapato, poderiam atacar órgãos do parasito que normalmente não são expostos diretamente, vindo, assim, substituir os antígenos salivares (expostos) (KEMP et al., 1989).

Em uma comparação realizada por Nuttall et al. (2006), foram apontadas características de antígenos ocultos e expostos. Algumas, agora relatadas: (1) a capacidade de ação ampla sobre espécies de carrapatos se mostrou maior para antígenos expostos pelo maior potencial de reação cruzada, como por exemplo, a proteína recombinante da saliva 64TRP, (2) atividade sobre todos os estágios de vida do carrapato com maior potencial para os antígenos expostos; a proteína 64TRP foi efetiva sobre ninfas e adultos de *R. appendiculatus* e *Ixodes ricinus*; usualmente, os antígenos ocultos tem eficácia sobre uma fase de vida do parasito, como foi o caso da proteína Bm86, que foi efetiva sobre fase adulta do *R. microplus* e de ninfas de *R. annulatus*, (3) imunidade de longa duração ainda não foi alcançada por nenhum dos dois de antígenos, pois, apesar do reforço natural quando do parasitismo de animais imunizados, pode haver supressão da resposta imune por moléculas da saliva, enquanto os antígenos ocultos requerem várias imunizações para efeito inicial de proteção contra o carrapato, e (4) quanto a resistência à vacina por seleção adaptativa, há maior probabilidade para os ocultos, porém, para ambos, pode ser minimizada com o uso de vacinas com múltiplos epítomos.

Em relação a identificação e caracterização de um primeiro alvo antigênico eficaz, alguns passos foram determinantes tais como os experimentos de Johnston et al. (1986), que demonstraram que a

vacinação de bovinos com extratos de fêmeas adultas de carrapatos induzia nos animais uma imunidade eficaz contra o antígeno do parasito. Posteriormente esses extratos foram identificados, purificados e denominados de Bm86, uma proteína do intestino médio do parasito, que foi sintetizada com uso de tecnologia de DNA recombinante (WILLADSEN, 1989; WILLADSEN, 1990; RODRÍGUEZ et al., 1994). Dessa proteína foram produzidas duas vacinas comerciais para controle de infestações pelo carrapato *R. microplus*, as quais não provocaram efeito de controle direto e nem a morte imediata dos carrapatos, mas uma redução sucessiva em números, como consequência da redução da fertilidade da fêmea adulta (RODRÍGUEZ et al., 1995).

A experiência de uso da vacina GavacTM, uma das disponíveis comercialmente, não foi satisfatória quanto à eficácia desejada, após ser testada a campo em países como México, Brasil e Argentina, conforme de la Fuente et al. (2007), embora o grau de proteção oferecido por ela tenha sido variável entre esses países (GUERRERO et al., 2012), por isso foi recomendado uso adicional de acaricidas em controles estratégicos do parasito. Porém, algumas estirpes do *R. microplus* existentes em Cuba como a Cenapa, Tuxpan e Camcord apresentaram boa proteção a campo, quando desafiadas com anticorpos vacinais produzidos pela mesma vacina, pois controlaram populações de carrapatos por pelo menos mais de 33 semanas (RODRIGUEZ et al., 1994). Em vista desses resultados foi possível afirmar que existe homologia de Bm86 entre essas diferentes estirpes e que é alta o suficiente para se obter imunidade protetora após a vacinação (PENICHER et al., 1994). Por oito anos foram analisados os efeitos da vacinação em mais de meio milhão de bovinos com a GavacTM, nesse mesmo País. O uso da vacina reduz em 87% a necessidade de acaricidas e também causou uma redução de 96% nos casos de babesiose (VALLE et al., 2004).

Adicionalmente, de acordo com Willadsen (2008a), os resultados pelo uso de vacinas baseadas na proteína Bm86, contra *R. microplus*, podem variar entre 10 e 89% de eficácia e pelas descobertas referentes a esse antígeno oculto, abriram-se caminhos para melhorar as chances de sucesso de uma segunda geração de vacina anticarrapato do boi. Um conjunto de antígenos surgiram como candidatos viáveis para o desenvolvimento de vacina e estão disponíveis (GUERRERO; MILLER; LEÓN, 2012).

Alguns novos antígenos estudados na América Latina e no Brasil, com diferentes percentuais de eficácia, foram identificados como a proteína “Yolk pro-Cathepsin” com eficácia de 25%, a SBm7462 com

81%, a ARS Antigen-1 com 76% (estudados no Brasil), além de Subolesina, com 51% e 81% de eficácia, e Ferritina- 2 com 64% de eficácia; sendo estes testados no México (GUERRERO et al, 2012). Porém nenhum deles gerou, até o momento, uma vacina comercial.

Apesar disso, algumas moléculas continuam sendo vistas como promissoras como é o caso da Ferritina 2 (FER2). Ela é específica do intestino e secretada na hemolinfa do carrapato, onde atua como um transportador de ferro e é expressa em todas as fases de desenvolvimento (HAJDUSEK et al., 2010). Além da proteína cemento 64P (64TRP) e da subolesina; a primeira, testada fora da América Latina apresentou boa reação cruzada para *R. sanguineus*, *I. ricinus*, *Amblyomma variegatum* e *R. microplus* (TRIMNELL et al., 2005; DE LA FUENTE; KOCAN, 2014); e a segunda, cuja função não foi precisamente definida, mas parece ter um papel na manutenção da imunidade inata do carrapato contra patógenos específicos (ZIVKOVIC et al., 2010).

Vale destacar, ainda, o sucesso da vacina sintética SBm7462, desenvolvida no Brasil, que é baseada em três epítomos imunogênicos (4822, 4823 e 4824) contidos na proteína derivada da Bm86 do carrapato *R. microplus*. Vinte cepas desse carrapato originário do Brasil, Argentina, Colômbia e Uruguai foram analisadas; e para cada população de parasitos, três fragmentos de cDNA contendo os nucleotídeos que codificam para os epítomos 4822, 4823 e 4824 foram sequenciados e as sequências de aminoácidos foram deduzidas e comparadas com os do gene Bm86 homóloga. Os resultados indicaram que as sequências de epítomos da vacina SBm7462 foram conservados nas populações do carrapato da América do Sul e a conservação de tais sequências é muito importante para a resposta imunológica de populações de *R. microplus* (PECONICK et al., 2008).

Afora os antígenos ocultos avaliados, Maruyama (2012), testou quatro antígenos salivares de *R. microplus* (proteínas recombinantes nomeadas de Rm39, Rm180, Rm23 e Rm72) em novilhas holandesas e obteve eficácia geral de 73%, cujas reduções de número e peso de teleóginas em relação ao grupo controle foi de 55% e 52% respectivamente. Suas funções antigênicas estão relacionadas a imunossupressão, bloqueio de fixação do parasito no hospedeiro e propriedades anticoagulantes; demonstrando, assim, efeito promissor de uma vacina multiantígeno.

Além do retorno das pesquisas com antígenos ocultos, as direções futuras no desenvolvimento de vacinas contra o carrapato, provavelmente, vão combinar antígenos de carrapatos com diferentes mecanismos de

proteção numa mesma formulação ou em combinação com antígenos derivados de agentes patogênicos para, em última análise, resultar na redução da infestação de carrapatos e afetarem infecções patogênicas para controlar a transmissão de doenças pelo carrapato (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015). Outras estratégias para se alcançar vacinas melhoradas são estudos de interações moleculares carrapato-patógeno-hospedeiro pela abordagem de vacinomics, que auxiliam na caracterização e validação de formulações vacinas. A abordagem de estudos de antígenos protetores visando populações humanas e animais para reduzir a exposição aos carrapatos, reduzindo o número de carrapatos infectados e sua capacidade em afetar a saúde humana e animal também são aceitas pela pesquisa (CONTRERAS et al., 2016).

Tecnologias existentes e facilitadoras para o desenvolvimento e consolidação dessas abordagens já são empregadas atualmente, tais como anotações em bancos de DNA (GenBank), que estão disponíveis e acessíveis na era pós-genômica, a bioinformática e a proteômica (que identifica sequências gênicas via transcrição por RNA e limita microarranjos de DNA antigênicos). Todas elas facilitam a descoberta e seleção de proteínas e/ou moléculas com maiores chances de desencadearem antigenicidade e uma proteção vacinal no hospedeiro (MARITZ-OLIVIER et al., 2012). O desenvolvimento dessas abordagens omics, centradas nos processos biológicos relevantes, se consolidam na descoberta de novos antígenos de proteção contra carrapatos. Provavelmente, vacinas futuras combinarão antígenos de carrapatos com diferentes mecanismos de proteção, ou sozinhos ou com antígenos derivados de organismos patogênicos para defesa contra doenças transmitidas por este parasito (DE LA FUENTE e CONTRERAS, 2015).

3.1 O uso de vacina comercial em estratégias de controle do carrapato em rebanhos bovinos da América do Sul

Conhecendo-se o ciclo de vida do carrapato e características epidemiológicas, pode-se utilizá-los em estratégias para controlar as populações como se faz com a rotação de pastagens (NORTON et al., 1983). Essa prática associada ao uso de acaricidas ou a integração pecuária-lavoura-pastagem é pouco utilizada no Brasil para controle do parasito (PEREIRA et al., 2008), porém, para além dessas técnicas de controle, alguns países da América Latina têm associado manejo de pastagem, uso de carrapaticida e de vacina anticarrapato em rebanhos bovinos.

O uso de vacina associado a carrapaticidas tem sido proposto para o controle em diversas regiões nas quais há infestação por *R. microplus*. Isso porque os efeitos da vacina comercial com a proteína Bm86 são a longo prazo e não tem o efeito *knock down* como dos carrapaticidas, que são recomendados para eliminar as cargas parasitárias inaceitáveis para saúde do rebanho; e outro ponto a ser considerado é que a vacinação prevê o tratamento (descontaminação) das pastagens para reduzir infestações nos animais, e não diretamente tratar os animais (LABRUNA, 2008; MAPHOLI, 2014). No Brasil, os custos relativamente altos das vacinas anti-*R. microplus* associados ao manejo diferenciado que se deve aplicar ao rebanho, pela vacinação, atuam como fatores limitantes para tal prática de controle (LABRUNA, 2008).

Em Cuba o uso de vacina anti-*R. microplus* é uma realidade que outros países vêm buscando através de esforços de diversos grupos de pesquisa” (GUIZZO et al., 2012). Nesse país iniciou-se um Plano Nacional de Controle Integrado contra o carrapato (PCI) no início da década de noventa. A utilização do imunógeno GavacTM (composto pelo princípio ativo Bm86) foi introduzida gradualmente pelo programa, que consiste em imunização estratégica em conjunto com a aplicação de tratamentos químicos de acordo com a infestação de animais. Nesse país, o PCI teve um grande impacto a nível nacional, tanto no controle veterinário, econômico e ambiental. No Brasil, Colômbia e Venezuela houve resultados semelhantes nas fazendas estudadas, quando usaram o imunógeno em um Programa de Controle Integrado correto (PEDROSO et al., 2007).

Na Venezuela foi realizado recentemente um estudo com a vacina GavacTM, pela primeira vez, num programa nacional integrado para o controle do carrapato dos bovinos, que incluiu mais de 1,9 milhões de bovinos, distribuídos por 18 estados da República daquele País. Após dois anos de execução do programa, 38.835 fazendas foram avaliadas, e 83,7% do uso de acaricidas químicos foi reduzido. O programa teve um grande impacto, economizando 81,5% do custo estimado dos tratamentos tradicionais de controle químico de carrapatos com uma redução de mais de 260 toneladas desses produtos. Com estes resultados, o uso de vacina para controle do carrapato do boi em programas de controle integrado mostrou-se viável (SUAREZ et al., 2016), podendo servir de exemplo e um impulso a avaliações similares em outros países da América Latina.

Alguns testes realizados a campo indicaram que as vacinas compostas pela proteína Bm86 têm eficácia somente quando a sua aplicação está incluída dentro de um programa de controle integrado que

harmoniosamente combina métodos diferentes (DE LA FUENTE et al., 2007; LABRUNA, 2008). Os métodos de controle de ixodídeos, aplicados isoladamente, não são plenamente eficazes. Mas, um protocolo de gestão integrada que inclua tratamentos com acaricidas efetivos, com base em níveis de infestação, a rotação de pastagens, e vacinação de todo o rebanho permite a redução de infestação de carrapatos e a diminuição na utilização de produtos químicos (REDONDO et al., 1999; DE LA FUENTE et al., 2007). Esses protocolos alternativos consistem na utilização de uma associação de medidas que visam reduzir: a probabilidade da emergência da resistência contra os carrapaticidas existentes; a população de carrapatos ao longo das sucessivas gerações e também diminuir ao máximo a utilização de carrapaticidas (SOUZA, 2004).

Além das tecnologias disponíveis para controle do carrapato do boi, a compreensão da bioecologia desse parasito e das relações dinâmicas que este estabelece dentro do sistema é o ponto de partida para a desconstrução da noção agressiva que temos dela. Este novo conceito permitirá aos atores, no sistema de produção, tomar decisões mais sustentáveis relacionadas com a gestão deste atributo essencial de agroecossistema de produção de gado (POLANCO-ECHEVERRY et al., 2016).

4 REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA

A pergunta norteadora desta revisão parte da necessidade de se ter maior clareza de fatores que determinam e distinguem a eficácia dos antígenos desenvolvidos para o controle do carrapato *R. microplus*. Alguns pesquisadores identificaram a necessidade de caracterizar antígenos protetores como apontaram Willadsen, (2008b) e Canales et al. (2009) Já outros entendem que se faz imperativo identificar novos antígenos protetores (RICHARDS et al., 2015). Porém, para esta pesquisa, pelo método de revisão de literatura, procura-se distinguir, ao selecionar artigos publicados em bases de dados, antígenos altamente eficazes e levantar causas de diferentes efeitos sobre parâmetros biológicos do carrapato *R. microplus*, e sobre a imunidade de bovinos, na América Latina. Dessa forma, optou-se por uma revisão sistemática de literatura.

A revisão sistemática é um método de busca e uso de dados secundários para uma pergunta específica. Em suma, consiste numa revisão bibliográfica, planejada e que utiliza métodos explícitos e sistemáticos para identificar, selecionar e avaliar criticamente os estudos,

além de coletar e analisar os dados destes estudos incluídos na revisão (CASTRO, 2001).

Por reunir toda evidência empírica que se encaixa em critérios de elegibilidade pré-especificados, busca reduzir a subjetividade em revisões (OXMAN; GUYATT, 1993; MOHER et al., 2009; CEE, 2013). As principais características de uma revisão sistemática são: um estabelecimento claro de objetivos com critérios pré-definidos de elegibilidade para estudos; metodologia reprodutível e explícita; uma pesquisa sistemática que tenta identificar todos os estudos que satisfazem os critérios de elegibilidade; uma avaliação da validade das conclusões dos estudos incluídos, por exemplo, através da avaliação do risco de viés; e uma apresentação sistemática, e síntese das características e das conclusões dos estudos incluídos (HIGGINS; GREEN, 2011).

Existem algumas controvérsias quanto a objetividade dos elementos da revisão sistemática, corroboradas por Borenstein et al. (2009), quando afirmaram que o fato de existir um elemento de subjetividade no estabelecimento dos critérios utilizados para seleção de estudos não permitiu dizer que este método seja inteiramente objetivo. No entanto, concordaram que, porque todas as decisões são claramente especificadas, os mecanismos utilizados são transparentes (BORENSTEIN et al., 2009; MOHER et al., 2009).

Inclusão de dados de estudos não publicados (ou resultados não publicados) é importante na minimização de viés. No entanto, isso pode ser demorado e os dados originais podem não estar mais disponíveis. Embora haja certo sucesso, para alguns tipos de estudo, quando da busca e obtenção de estudos não publicados, o mesmo pode não ser verdade para alguns tipos de avaliação. A prática de localizar e obter informações a partir de estudos não publicados pode, por exemplo, tornar o ideal de inclusão de estudos não publicados relevantes, inatingíveis pelas escalas de tempo disponíveis para realização da revisão, conforme *Guidance for undertaking reviews in health care* (CRD's, 2009).

Dessa forma, o plano de análise resulta do objetivo científico da avaliação; e considerando que revisões sistemáticas têm diferentes tipos de objetivos, podem elencar e conter diferentes abordagens para a análise.

A presente revisão sistemática contribuirá para sintetizar, de um modo replicável, as evidências disponíveis sobre a ação de vacinas anticarrapato.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Analisar diferenças entre antígenos, bem como fatores nos ensaios de desafio, que foram determinantes para eficácia no controle do *R. microplus*, na América Latina.

5.2 Objetivos específicos

- Selecionar, por revisão sistemática de literatura, ensaios de desafio que avaliaram antígenos candidatos para o controle de infestações por *R. microplus* em bovinos, na América Latina, sob condições de laboratório;
- Analisar características de moléculas antigênicas, dos ensaios/estudos incluídos pela revisão sistemática, em relação a capacidade de induzir o controle do carrapato *R. microplus*;
- Comparar fatores relacionados a qualidade dos ensaios de desafio, incluídos pela revisão sistemática, a fim de pontuar aqueles que possam ter exercido maior influência na eficácia vacinal e controle de infestações pela espécie *R. microplus* em bovinos; e
- Realizar meta-análise para selecionar antígenos candidatos superiores em seus efeitos, em relação aos demais, sobre parâmetros biológicos do *R. microplus*.

6 MÉTODO

6.1 Estruturação

A revisão sistemática foi realizada com adaptações ao recomendado no guia CRD (UNIVERSITY OF YORK, 2009) e o Cochrane Handbook (HIGGINS; GREEN, 2011). Dessa forma, após a identificação da necessidade da revisão sistemática, sua estruturação seguiu os seguintes passos: (1) delineamento da estratégia de busca; (2) seleção dos estudos; (3) avaliação da qualidade metodológica; (4) extração dos dados; e (5) síntese dos dados.

6.1.1 Delineamento da estratégia de busca

Foi realizada uma pesquisa na literatura disponível sobre antígenos candidatos à vacina para controle de *R. microplus*, avaliados na América Latina. Fez-se uma busca de artigos publicados em três bases de dados eletrônicos: PubMed, Web of Science e CAB. Nas três bases de dados foram utilizadas as seguintes combinações de termos: (1) “tick” AND “vaccine” AND “efficacy”; (2) “*Rhipicephalus*” AND “microplus” AND “vaccine” AND “antigen”; e (3) “tick” AND “vaccine” OR “immunization” AND “cattle”. Esses mesmos conceitos foram empregados sem o uso de aspas na tentativa de encontrar resultados mais abrangentes. Nas três bases, refinou-se a busca por (i) período (de 1994 a 2015), (ii) tipo de documento: artigo para Web of Science; abstrat para CAB e texto completo para Pubmed; e (iii) países e/ou línguas da América do Sul; pois foram consideradas associações/construtores específicos de cada base para maior sensibilidade de busca.

Foram baixados artigos de revisão de literatura sobre o tema, como meio potencial de elencar estudos adicionais. Não foi realizada busca em literatura cinza.

6.1.2 Critérios de inclusão

Todos os artigos recuperados pela busca nas três bases de dados tiveram seus resumos e textos completos avaliados. Foram incluídos somente artigos que: (1) consistiram de ensaios randomizados que avaliaram antígenos para controle de estirpes da espécie de carrapato *R. microplus*; (2) avaliaram estirpes encontradas e estudadas na América Latina, por meio de teste desafio em animais de laboratório, com

avaliação da eficácia do antígeno sobre, ao menos, dois parâmetros biológicos e realizados nos anos de 1994 a 2015; (3) apresentaram informação do grau de sangue (raça) e idade dos bovinos avaliados; e (4) continham no mínimo três animais por grupo do experimento.

6.1.3 Avaliação da qualidade metodológica

Os estudos foram avaliados quanto ao atendimento dos requisitos de delineamento de testes de carrapaticidas em estábulo (AMARAL, 1993; BRASIL, 1997), aos requisitos de seleção dos animais (NAKAGAWA; CUTHILL, 2007; STEPHEN et al., 2015; SCHETTERS et al., 2015) e de condução do experimento, todos relacionados a validade interna do experimento (FLETCHER et al., 1996), isto é, caracterizam boa qualidade do ensaio.

Esses critérios permitiram o delineamento de indicadores de risco baixo e moderado a alto de viés conforme preconiza o Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions 5.1.0 (HIGGINS; GREEN, 2011); foi possível avaliar risco de viés de seleção, desempenho e informação a partir de:

- Método de alocação dos bovinos expostos: para cada um dos critérios a seguir foi (i) adequado, quando houve pareamento de idade, sexo e grau de sangue (raça) entre os grupos tratados e controle; os ensaios apresentaram o mesmo número de indivíduos dentro dos grupos e atenderam a quantidade de animais (mínimo cinco), conforme Brasil (1997); foi explicada a forma de alocação, bem como se seguiu os critérios de sorteio e elegibilidade, iniciando-se pelos animais mais sensíveis (com maior número de teleóginas), para comporem as repetições antes do tratamento específico, conforme Brasil (1997); (ii) inadequado, quando não houve pareamento de idade, sexo e grupo sanguíneo; grupo tratado e o grupo controle não apresentava o mesmo número de indivíduos; e não foi explicada a forma de alocação e nem foram atendidos critérios de sorteio e elegibilidade dos animais nos grupos.
- Método de intervenção e condução dos experimentos: para cada um dos critérios a seguir foi (i) adequado, quando o local foi apropriado para os animais infestados (baías individuais com piso ripado); atendimento a tratamentos para animais de laboratório e/ou cuidados veterinários durante experimento; a forma de infestação por larvas nos animais foi apropriada (porção pélvica e/ou dorsal, ou em câmara de

alimentação); a quantidade de larvas (mínimo 2.500 larvas) foi apropriada para infestação de desafio; a forma de coleta de teleóginas foi apropriada (apenas as destacadas espontaneamente da pele) até o final do experimento; e informação se houve perda ou grande debilitação verificada nos animais testados; (ii) inadequado, quando sucedeu o contrário dos critérios da opção (i).

Após coletar as informações acerca dos métodos utilizados, os estudos foram categorizados, com algumas adequações ao que preconiza o Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions 5.1.0 (HIGGINS; GREEN, 2011), como de:

(1) Baixo risco de viés:

Presença de plausibilidade de erros que não enfraquecem a confiança dos resultados se todos os critérios foram possíveis de serem avaliados e adequados.

(2) Moderado a alto risco de viés:

Houve plausibilidade de viés (s) que afeta(m) a interpretação dos resultados e/ou enfraquece (m) seriamente a confiança dos resultados, quando um ou mais critérios não foram encontrados e, quando encontrados, foram inadequados.

6.1.4 Extração de dados

Após seleção dos artigos incluídos, coletaram-se dados, os quais foram tabulados no programa excel – plataforma Windows 8 (Microsoft). Uma planilha com dados de todos os ensaios incluídos foi utilizada para classificação, subdivisão e síntese de acordo com suas similaridades, a fim de facilitar a análise das características das moléculas.

6.1.5 Meta-análise

Após a avaliação metodológica foi conduzida a metanálise. Conforme os estudos atenderam aos pressupostos necessários, conduziu-se análise de efeito do tratamento vacinal sobre controle de carrapato.

De cada estudo anotou-se o tamanho amostral, média e medida de dispersão dos tratamentos que receberam vacina e dos controles. Foi calculado como medida de tamanho de efeito o *g* de Hedges (BORENSTEIN et al., 2009):

$$g = d \times J$$

$$d = \frac{\overline{X_C} - \overline{X_T}}{\sqrt{\frac{(n_T - 1)s_T^2 + (n_C - 1)s_C^2}{n_T + n_C - 2}}}$$

$$J = 1 - \frac{3}{4gl - 1}$$

Onde d é o d de Cohen; J é o fator de correção para amostras pequenas; $\overline{X_T}$ é a média da variável resposta (carga, peso de fêmeas ingurgitadas coletadas, fertilidade ou ovopostura) para o tratamento; $\overline{X_C}$ é a média da variável resposta para o controle; n_T é o tamanho amostral do tratamento; n_C é o tamanho amostral do controle; s_T^2 é a variância do tratamento; s_C^2 é a variância do controle; e gl são os graus de liberdade ($n_T + n_C - 1$). Valores positivos de g indicam que o tratamento apresentou maior efeito do que o controle.

A variância de cada tamanho de efeito (V_g) foi estimada pela seguinte equação (BORENSTEIN et al., 2009):

$$V_g = J^2 \times V_d$$

$$V_d = \frac{n_T + n_C}{n_T n_C} + \frac{d^2}{2(n_T + n_C)}$$

Onde V_d é a variância do d de Cohen.

Foi calculado o tamanho de efeito acumulado assumindo um modelo de efeitos aleatórios (BORENSTEIN et al., 2009). Como cada estudo reportou mais de um tamanho de efeito, a dependência entre os tamanhos de efeitos foi incorporada no cálculo do tamanho de efeito acumulado pelo método de estimativa de variância robusta-EVR (HEDGES et al., 2010). O uso da EVR evita que viole-se o pressuposto de independência entre os tamanhos de efeitos e controla-se correlações entre os tamanhos de efeitos reportados em um mesmo estudo (HEDGES et al., 2010; TANNER-SMITH e TIPTON, 2014). Na EVR, o tamanho

de efeito acumulado foi estimado ponderando cada tamanho de efeito pelo inverso da média das variâncias do grupo de tamanhos de efeitos de cada estudo (HEDGES et al., 2010; TANNER-SMITH; TIPTON, 2014):

$$W_{ij} = \frac{1}{\overline{v_{\bullet j}}[1 + (k_j - 1)\rho]}$$

Onde w_{ij} é o peso do tamanho de efeito i do estudo j ; $\overline{v_{\bullet j}}$ é a variância média dos tamanhos de efeitos do estudo j ; k_j é o número de tamanhos de efeitos dependentes do estudo j ; e ρ é a correlação entre os tamanhos de efeitos. Escolheu-se ρ igual a 0,8 para o cálculo dos pesos e o efeito da escolha desse valor de correlação foi avaliado por análise de sensibilidade (HEDGES et al., 2010).

Para a avaliação do viés de publicação, foram calculados tamanhos de efeitos médios e variâncias médias por estudo (i.e. número de tamanhos de efeitos para essa análise foi de dez). O viés de publicação sobre a estimativa do tamanho de efeito acumulado foi avaliado pelo número a prova de falhas de Rosenthal (ROSENTHAL, 1979) e o procedimento de "apara e preenche" (DUVAL; TWEEDIE, 2000). Adotou-se um nível de significância de 5%, logo o número a prova de falhas de Rosenthal indica quantos estudos com tamanho de efeito iguais a zero seriam necessários para mudar a significância observada para um valor acima de 5%. O procedimento "apara e preenche" é um processo iterativo onde são retirados os maiores tamanhos de efeitos, seus "espelhos" são estimados (i.e. o mesmo valor do tamanho de efeito, mas com sinal inverso) e o tamanho de efeito acumulado é recalculado (DUVAL; TWEEDIE, 2000; BORENSTEIN et al., 2009). O procedimento "apara e preenche" avalia, assim, a magnitude do efeito dos estudos potencialmente omitidos por viés de publicação sobre o tamanho de efeito observado.

As análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2015), com auxílio do pacote "robumeta" (FISHER; TIPTON, 2014) para o cálculo da EVR e análise de sensibilidade. O pacote "metafor" (VIECHTBAUER, 2010) foi utilizado para as análises de viés de publicação.

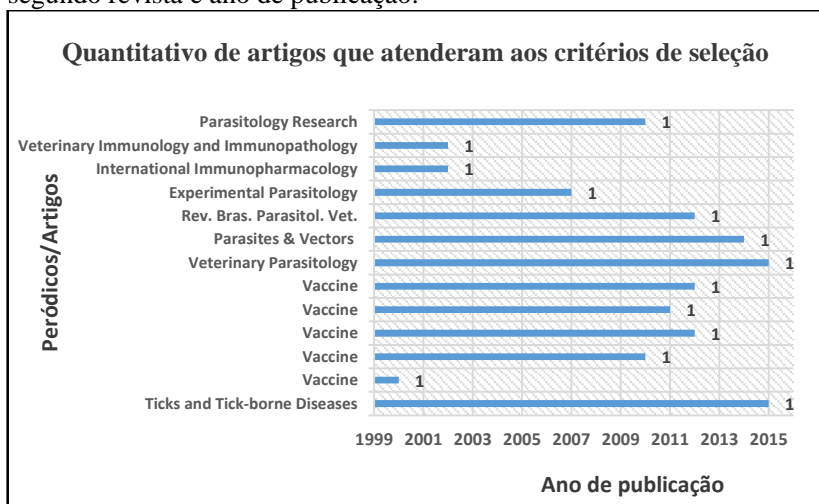
7 RESULTADOS

7.1 Estratégias de busca da pesquisa

A busca sistematizada contemplou artigos publicados até 31 de dezembro de 2015 e resultou em 3.883 referências, das quais 3.870 não foram consideradas relevantes, para esta revisão, por não atenderem aos critérios de inclusão, apresentarem elementos diversos aos objetivos da pesquisa, ou por duplicidade. Não foi adicionado nenhum estudo pertencente a cada um dos 12 artigos de revisão de literatura encontrados, conforme Apêndice-C, ou por já ser estudo objeto do conjunto da seleção, ou por se encontrar indisponível nas bases de dados, ou por não atender aos critérios de inclusão.

Assim, 26 artigos, considerados relevantes, foram separados e analisados na íntegra e, destes, 13 foram incluídos; o fluxograma do processo de busca consta no Apêndice-A. Os artigos excluídos e respectivas justificativas de exclusão contam no Apêndice-B. Nove periódicos publicaram os artigos incluídos na pesquisa, conforme a Figura 1, na qual apresenta-se uma escala indicadora do ano de publicação.

Figura 1 – Quantidade de artigos incluídos na revisão sistemática segundo revista e ano de publicação.



Dentre os artigos estudados, quatro deles contém avaliação de mais de uma molécula antigênica para a espécie *R. microplus*, perfazendo, desse modo, um total de 19 antígenos analisados entre todos os artigos incluídos. Tais moléculas foram testadas para controle de estirpes de *R. microplus* presentes no Brasil, México e Cuba.

7.2 Características dos estudos incluídos

Os artigos incluídos caracterizaram-se por ensaios de desafio em condições de laboratório de centros de pesquisa, em bovinos com idade entre 6 a 24 meses, aleatorizados para os grupos tratamento e controle; delineados por três repetições para cada grupo tratado, no mínimo. As raças de bovinos testadas foram taurinas holandesa, jersey, mestiça de beefmaster e charolês, taurina pura não identificada e taurinos mestiços não identificados; zebuínas nelore, e mestiças de zebuínas com taurinas (nelore e simental), perfazendo 93 animais tratados e 94 controles, totalizando 187 animais avaliados. Esses animais, de acordo com os ensaios testes, sofreram desafio por larvas de estirpes diferentes de *R. microplus*.

Dentre os ensaios, quatro (PATARROYO et al., 2002; ALMAZÁN et al., 2012; RODRÍGUEZ-MALLON et al., 2015; e ALI et

al., 2015) desafiaram bovinos não sensibilizados previamente por espoliação de carrapato. A forma de infestação por larvas, nos ensaios, não foi homogênea.

Em relação ao uso de controle positivo, lançaram mão desse teste comparativo GARCÍA-GARCÍA et al. (2000); ALMAZÁN et al. (2010); e HAJDUSEK et al. (2010), os quais, respectivamente, usaram a vacina comercial com a proteína Bm86 (GAVACTM) e os dois últimos, a proteína Bm86, de composição vacinal não comercial; enquanto PATARROYO et al. (2002) utilizaram dois tipos de controle negativo: (i) saponina adicionada a água destilada deionizada e (ii) apenas água destilada deionizada.

Os 13 estudos incluídos tiveram seus dados sintetizados, bem como caracterizados (Quadro 1).

Quadro 1 – Características dos estudos incluídos

Estudo/ensaio	País	Antígeno	Estirpe	Intervenção vacinal/condução experimental	Dose ³	Adjuvante
1-RODRÍGUEZ-MALLON et al. (2015)	Cuba	pPO	Cayo Coco	Vacinação IM ¹ em quatro doses de 2ml, com intervalos de 21, 15 e 24 dias. Cada bovino foi infestado do com cerca de 3000 larvas, distribuídas por três dias consecutivos.	0,25	VG Montanide 888
2-GARCÍA-GARCÍA et al. (2000)	Cuba	Bm95 Bm95	Camcord A-Argentina	Vacinação IM ¹ em três doses de 2ml, com intervalos de 30 e 15 dias. Duas semanas após última injeção, cada bovino foi infestado com 2000 larvas.	0,1	Montanide 888
3-ALI et al. (2015)	Brasil	BrRm-MP4	Porto Alegre	Vacinação SUBC ² em quatro doses de 2ml, com intervalos de 15 dias. Dez dias após a última injeção, cada bovino foi infestado com 20.000 larvas.	0,1 1 ^a e 2 ^a , 0,2 3 ^a e 4 ^a	Montanide 888
4-GUERRERO et al.(2014)	Brasil	RmAQP1 (a) e (b)	Campo Grande	Vacinação IM ¹ em três doses de 2ml, com intervalos de duas semanas. Vinte e um dias após a última injeção, os bovinos foram desafiados com 15.000 larvas, distribuídas em três vezes numa semana.	0,1	Montanide ISA 61 VG
5-CUNHA et al. (2012)	Brasil	rBm86-CG	Campo Grande	Vacinação IM ¹ em três doses de 2ml, com intervalo de duas e quatro semanas. Vinte e um dias após a última injeção, os bovinos foram infestados com 15.000 larvas, distribuídas em três aplicações, por uma semana.	0,1	Montanide ISA 61 VG
6- ANDREOTTI et al. (2012)	Brasil	rRmLTI	Campo Grande	Vacinação IM ¹ em duas doses de 2ml, com intervalo de quatro semanas. Vinte e um dias após a última injeção, bovinos foram infestados com 15.000 larvas distribuídas em três dias alternados.	0,1	Montanide ISA 61 VG
7- ANDREOTTI, (2007)	Brasil	BmTI-A	Campo Grande	Vacinação SUBC ² em três doses de 2ml, com intervalo de uma semana. Vinte e um dias após a última vacinação, bovinos foram infestados com 15.000 larvas, distribuídas em três dias alternados.	0,1	Saponina

¹IM- intramuscular; ²SUBC- subcutânea; Dose³ -mg

continuação

conclusão

8- ANDREOTTI et al. (2002)	Brasil	BmTIs	Campo Grande	Vacinação SUBC ² em três doses, com intervalos de vinte e um dias. Duas semanas após a última injeção, cada bovino foi infestado por 20.000 larvas. Confinamento adaptado para coleta de teleóginas após infestação até o final do experimento.	0,1	Vehicle
9- PATARROYO et al. (2002)	Brasil	SBm7462 SBm 4912 SBm19733	BmUFV1	Vacinação SUBC ² em três doses de 4ml, com intervalos de trinta dias. Vinte e um dias após a última injeção, os bovinos foram infestados com 4.500 larvas por três dias consecutivos. Utilizou alojamento individual a prova de artrópodes.	2,0 2,0 2,0	Saponina
10- ALMAZÁN et al. (2012)	México	EF1a-MSP1a BM95-MSP1a UBQ-MSP1a SUB-MSP1a	Media Joya	Vacinação IM ¹ em três doses de 1ml, com intervalos de trinta dias. Duas semanas após a última injeção os bovinos foram infestados por 5.000 larvas alocadas em câmara de alimentação. Animais contidos para os ensaios.	0,12 0,12 0,12	Montanide ISA 50 V2
11- MERINO et al. (2011)	México	SUB-(1)	Media Joya	Vacinação IM ¹ em três doses de 2ml, com intervalos de 28 e 21 dias. Trinta dias após a última injeção os bovinos foram infestados com 2.000 larvas distribuídas em três câmaras de alimentação (500 para cada uma). Animais contidos para os ensaios.	0,1	Montanide ISA 50 V
12- HAJDUSEK et al. (2010)	México	RmFER2	Media Joya	Vacinação IM ¹ em três doses de 2ml, com intervalos de 23 e 15 dias. Duas semanas após a última injeção, bovinos foram infestados com 20.000 larvas (10.000 de <i>R. annulatus</i> e 10.000 de <i>R. microplis</i> em câmaras de alimentação separadas. Animais contidos para os ensaios.	0,1	Montanide ISA 50 V
13- ALMAZÁN et al. (2010)	México	UBQ; SUB-(2)	México	Vacinação IM ¹ em três doses de 2ml, com intervalos de 23 e 15 dias. Duas semanas após a última injeção, bovinos foram infestados com 20.000 larvas (10.000 de <i>R. annulatus</i> e 10.000 de <i>R. microplis</i> em câmaras de alimentação separadas).	0,1	Montanide ISA 50 V

7.2.1 Classificações dos antígenos segundo característica de replicação e imunogenicidade

Os dezenove antígenos distribuídos nos 13 estudos foram separados em seis classes conforme os modos de replicação antigênica: recombinantes, sintéticos, recombinantes quiméricos, nativo, nativo e sintético recombinante, e recombinantes sintéticos (Tabela 1). Para recombinação gênica ou a levedura *Pichia pastoris* ou a bactéria *Escherichia coli* foram os vetores de clonagem e apenas um estudo com a técnica de recombinação utilizou pGEM-T vetor (Promega).

Os 19 antígenos estimularam a produção de anticorpos específicos, e 12 deles não tiveram a classificação de anticorpo definida, conforme os dados da Tabela 1.

conclusão

RECOMBINANTE SINTÉTICO	MX	<i>SUB</i>	Abrangente	ATC-E ²	Solúvel e/ou Secretada	Nº de FI ⁵
	MJ	<i>SUB</i>	Larva	ATC-E ²	Solúvel e/ou Secretada	Nº de FI ⁵

Origem do antígeno¹ - segundo artigo selecionado pela RS e/ou por estudo realizado por Richards et al. (2015). E²-anticorpo específico; Efeito³- efeito sobre parâmetros biológicos do *R. microplus* após cálculo de DT, DO e DF. Peso de ovos/F⁴- média de peso de ovos por fêmea ingurgitada; FI⁵ – fêmeas ingurgitadas. *Estirpes: PA-Porto Alegre, CG-Campo Grande, C-Camcord, A-Argentina, MJ-Media Joya, MX-México, CC-Cayo Coco, UFV1- BmUFV1. **AM- proteína de superfície de *Anaplasma marginale*.

7.2.2 Classificação da eficácia geral das moléculas

A literatura atual não dispõe de um padrão de classificação de eficácia. Consequentemente, foi empregada como base de classificação: (i) a Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e (ii) estudos que usaram a proteína vacinal Bm86, em países da América Latina (DE LA FUENTE e KOCAN, 2014). A Portaria dispõe sobre uso de antiparasitários e estabelece eficácia mínima de 95% para carrapaticidas comercializados no Brasil. Já os estudos na América Latina indicam uma eficácia média geral de 64% sobre o controle do *R. microplus* (DE LA FUENTE e KOCAN, 2014). Desse modo, a eficácia foi classificada em baixa, quando menor que 50%, mediana a partir de 50% e alta, a partir de 95% (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação da eficácia geral das moléculas segundo fórmula de cálculo empregada.

ESTUDO	ANTÍGENO	PAÍS	ESTIRPE	E% GERAL ^x	CLASS IFICA ÇÃO DE E%
RODRÍGUEZ-MALLON et al. (2015)	pPO	Cuba	Cayo Coco	96 ¹	Alta
GARCÍA-GARCÍA et al. (2000)	Bm95	Cuba	Camcord	89 ²	Mediana
GARCÍA-GARCÍA et al. (2000)	Bm95	Cuba	A-Argentina	58 ²	Mediana
ALI et al. (2015)	rBrRm-MP4	BR ^a	Porto Alegre	60 ³	Mediana
GUERRERO et al. (2014)	RmAQP1 (a)	BR	Campo Grande	68 ⁴	Mediana
GUERRERO et al. (2014)	RmAQP1 (b)	BR	Campo Grande	75 ⁴	Mediana
CUNHA et al. (2012)	rBm86-CG	BR	Campo Grande	31 ²	Baixa
ANDREOTTI et al. (2012)	rRmLTI	BR	Campo Grande	32 ²	Baixa
ANDREOTTI, (2007)	BmTI-A	BR	Campo Grande	18,40 ²	Baixa
ANDREOTTI et al. (2002)	BmTIs	BR	Campo Grande	72,80 ⁵	Mediana
PATARROYO et al. (2002)	SBm7462	BR	BmUFV1	75,58 ²	Mediana
PATARROYO et al. (2002)	SBm 4912	BR	BmUFV1	64,42 ²	Mediana
PATARROYO et al. (2002)	SBm19733	BR	BmUFV1	22,57 ²	Baixa
ALMAZÁN et al. (2012)	EF1a-MSP1a	MX ^b	Media Joya	38 ²	Baixa
ALMAZÁN et al. (2012)	BM95-MSP1a	MX	Media Joya	64 ²	Mediana
ALMAZÁN et al. (2012)	UBQ-MSP1a	MX	Media Joya	ND**	ND**
ALMAZÁN et al. (2012)	SUB-MSP1a	MX	Media Joya	81 ²	Mediana
MERINO et al. (2011)	SUB	MX	Media Joya	75 ⁶	Mediana
HAJDUSEK et al. (2010)	RmFER2	MX	Media Joya	64 ²	Mediana
ALMAZÁN et al. (2010)	UBQ	MX	México	55 ²	Mediana
ALMAZÁN et al. (2010)	SUB	MX	México	51 ²	Mediana

^xFórmulas de eficácia utilizadas nos estudos: E%=100x[1-(RAXPAxVAXOAXFE)]¹; E%= 100 x [1-(CRT x CR0 xCRF)]²; E%=100 x [1 - (NFE x WE xWL)]³; E%=100 x [1 - (NET xEWPF xH)]⁴; E% = 100 [1-(NET x EW x EF)]⁵; e E%=100 [1-(CRTxCR0)]⁶; ND**Não determinado; a:Brasil; b:México.

Os autores dos estudos desta revisão lançaram mão, para cálculo em separado sobre cada parâmetro biológico, das fórmulas seguintes: efeito sobre número de fêmeas ingurgitadas DT {100x [1- fêmeas

ingurgitadas tratadas/fêmeas ingurgitadas grupo controle]]; efeito sobre a ovoposição DO $\{100 \times [1 - \text{peso médio de ovos do grupo tratado} / \text{peso médio de ovos do grupo controle}]\}$; efeito sobre fertilidade de ovos DF $\{100 \times [1 - \text{peso médio das larvas por grama de ovos do grupo tratado} / \text{peso médio das larvas por grama de ovos do grupo controle}]\}$ (CANALES et al., 1997; de la FUENTE et al., 1999). A fórmula mais usada para cálculo da eficácia usou os seguintes índices: CRT- coeficiente de redução de fêmeas ingurgitadas; CRO- coeficiente de redução da capacidade de postura de ovos; CRF- coeficiente de redução na fertilidade (CANALES et al., 1997; de la FUENTE et al., 1999). Esses coeficientes são calculados a partir da razão entre a variável do grupo tratado e a mesma variável do grupo controle. Em apenas um ensaio foram utilizados esses índices, como seguem: RA: mortalidade de fêmeas durante o parasitismo; PA: peso das fêmeas recuperadas; VA: fêmeas aptas a postura; OA: peso de massa de ovo; FE: fertilidade de ovos. Vale ressaltar que em todos os casos os índices foram relacionados ao grupo controle, bem como houve variações de denominações e/ou significados de índices em três ensaios, sendo: NET- equivalente a CRT; EWPF- equivalente a CRO; H- redução na eclodibilidade; EW- equivalente a CRO; EF- relação entre pesos de ovos e de fêmeas ingurgitadas; NFE-número de fêmeas ingurgitadas; WE- capacidade de postura de ovos; WL- fertilidade dos ovos (percentual de eclosão).

7.2.3 Características da condução dos experimentos/ensaios

Diferenças foram encontradas nos protocolos de infestações por larvas, bem como nos procedimentos para aferição de parâmetros pós coleta de teleóginas, após tratamentos, nos 13 ensaios. Nenhum estudo seguiu integralmente o que consta na norma para teste de antiparasitários de uso veterinário, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997) e/ou o guia de avaliação de carrapatos (AMARAL, 1993). Dentre os ensaios incluídos e realizados no Brasil, uns intercalaram os dias de infestações e outros não, mas todos as iniciaram somente após, em média, vinte dias da última dose do antígeno vacinal. A estirpe Campo Grande, desafiada em cinco ensaios, esteve em quatro estudos (GUERRERO et al., 2014; CUNHA et al., 2012; ANDREOTTI et al., 2012; e ANDREOTTI, 2007) que intercalaram as infestações em três dias alternados em uma semana, e o ensaio (ANDREOTTI et al., 2002) realizaram intensa infestação de uma só vez.

A estirpe porto alegre foi desafiada em um ensaio (ALI et al., 2015),

o qual realizou infestação única. E no ensaio (PATARROYO et al., 2002) houve três infestações consecutivas da estirpe BmUFV1.

Nos dois ensaios realizados em Cuba, em um, as infestações ocorreram por três dias consecutivos (em cada dia uma câmara infestada) nos animais dos grupos controle e tratamento (RODRÍGUEZ-MALLON et al., 2015); no outro, a infestação se deu em um dia, mas em câmaras separadas, e no México, em todos os estudos se realizou infestação num mesmo dia.

Quanto ao grau de infestação, e procedimentos de coleta de teleóginas, as variações mais drásticas ocorreram nos ensaios, do Brasil, por exemplo, ALI et al. (2015); e ANDREOTTI et al. (2002) infestaram os animais com 20.000 larvas em uma única vez; enquanto no México, ALMAZÁN et al. (2010) e HAJDUSEK et al. (2010) realizaram infestações com de 10.000 larvas de *R. annulatus* e 10.000 de *R. microplus* em única vez (Quadro 2).

Já diferenças nos procedimentos para aferição de parâmetros pós coleta de teleóginas ocorreram, em Cuba, (RODRÍGUEZ-MALLON et al., 2015), pois a massa de 2g de ovos foi amostrada conforme pools de postura, e não o peso de massa de ovos total após a postura das fêmeas ingurgitadas; uma outra particularidade foi encontrada no ensaio de ANDREOTTI et al. (2012), em que o tempo de coleta de teleóginas foi determinado para 13 dias a partir da queda espontânea dessas fêmeas. Nos demais estudos o período de coleta acompanhou o período de queda natural das teleóginas, sem determinação de massa de ovos amostrados e nem período de coleta das fêmeas ingurgitadas.

Esses dados foram dispostos em quadros e figuras para, após, serem melhor comparados (Quadros 1 e 2), (Figuras 2 e 3).

7.2.4 Diferenças entre pesos de teleóginas dos grupos controle e tratamento após desafio com os antígenos estudados

As médias de pesos das fêmeas ingurgitadas foram informadas e/ou possíveis de serem calculadas em 11 estudos incluídos, mas as diferenças estatísticas foram informadas apenas em nove estudos (Quadro 3).

Como consequência do predomínio de testes sobre raças taurinas (Quadro 2), os testes tenderam em relacionar o efeito dos antígenos com produção de anticorpos sobre o grau de sangue europeu, que naturalmente favorece o parasitismo e leva a maior número de teleóginas, as quais

alcançam maior tamanho e consequentemente põem mais ovos que aquelas provenientes de gado zebuíno.

Quadro 2 – Variabilidade apresentada na condução experimental quanto ao tipo de alojamento, tipo de infestação e na alocação dos animais quanto o grau de sangue, nos diferentes estudos incluídos.

Local	Estirpe	Tipo de alojamento	Tipo de Infestação	Grau de sangue	Estudo
Brasil	Campo Grande	Baixas individuais	Larvas livres	Holandês	GUERRERO et al. (2014)
		NI** e após infestação	Larvas livres	Nelore	ANDREOTTI et al. (2002)
		NI**	Larvas livres	Holandês	CUNHA et al. (2012)
		NI**	Larvas livres	Holandês	ANDREOTTI et al. (2012)
	BmUFV1	Alojamento individual a prova de artrópodes	Larvas livres	Nelore e Simental	ANDREOTTI (2007)
Cuba	Porto Alegre	Baixas individuais à prova de carrapato/ piso com grelhas	Larvas livres	Jersey	PATARROYO et al. (2002)
	Cayo Coco	Baixas individuais	Câmara de alimentação	Taurino	ALI et al. (2015)
	Camcord A-Argentina	NI**	Câmara de alimentação	Holandês	RODRÍGUEZ-MALLON et al. (2015)
	Media Joya	NI**	Câmara de alimentação	Beefmaster e Charolais	GARCÍA-GARCÍA et al. (2000)
México	México	NI**	Câmara de alimentação	Taurino cruzado	ALMAZÁN et al. (2012)
		NI**	Câmara de alimentação	Taurino cruzado	MERINO et al. (2011)
		NI**	Câmara de alimentação	Taurino cruzado	HAJDUSEK et al. (2010)
					ALMAZÁN et al. (2010)

RmAQP1 (a) e (b)*: dois ensaios que testaram o mesmo antígeno e pertencentes a um estudo; NI**: não informado, mas realizado em centro de pesquisa

Quadro 3 – Diferenças estatísticas em relação às médias de pesos de telóginas dos grupos controle e dos grupos de tratamento, após desafio com diferentes antígenos candidatos, nos estudos incluídos.

Local	Estirpe	Antígeno	T-mg/fêmea	C-mg/fêmea	Significância estatística	Estudo
Brasil	Campo Grande	RmAQP1 (a)	250 ^a	273,3 ^a	NI*	GUERRERO et al. (2014)
		RmAQP1 (b)	264,25 ^a	288,36 ^a	NI*	ANDREOTTI et al. (2002)
		Bm11s	194 ^a	227 ^a	NI*	CUNHA et al. (2012)
		rBm86-CG	NI*	NI*	Significativa p<0,05 ^b	ANDREOTTI et al. (2012)
		rRmL11	210 ^a	277 ^a	Não Significativa p<0,001 ^c	ANDREOTTI (2007)
	BmUFV1	BmTLA	240 ^a	246 ^a	NI*	PATARROYO et al. (2002)
		SBm7462	NI*	NI*	Significativa p<0,05 ^b	ALI et al. (2015)
		SBm4912	285 ^a	278 ^a	Significativa p<0,001 ^b	RODRIGUEZ-MALLON et al. (2015)
		SBm19733	0,14 ^a	0,27 ^a	Significativa p<0,01 ^b	GARCÍA-GARCÍA et al. (2000)
		rBrRm-MP4	124 ^a	199 ^a	Significativa p<0,01 ^b	ALMAZÁN et al. (2012)
México	Cayo Coco	pPQ	302 ^a	416 ^a	Não significativa p<0,01 ^b	MERINO et al. (2011)
		Bm95	244 ^a	261 ^a	Significativa p<0,01 ^b	HAJDUSEK et al. (2010)
		UBQ- MSP1a	196 ^a	261 ^a	Significativa p<0,01 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
		UBQ- MSP1a	239 ^a	261 ^a	Não significativa p<0,01 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
		SUB- MSP1a	164 ^a	293 ^a	Significativa p<0,01 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
	Media Jova	SUB	286 ^a	293 ^a	Não significativa p<0,01 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
		RmFER2	242 ^a	276 ^a	Significativa p<0,05 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
		UBQ	251 ^a	276 ^a	Não significativa p<0,05 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
		SUB	277 ^a	276 ^a	Não significativa p<0,05 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)
					Não significativa p<0,05 ^b	ALMAZÁN et al. (2010)

Nota -T: grupo controle; NI*: não informado; a: média de peso por fêmea; b: t-test; c: Mann-Whitney; d: F-teste.

7.2.5 Mecanismos de ação e funções dos anticorpos vacinais dos antígenos estudados na presente revisão

Os ensaios demonstraram uma quantidade muito pequena de antígenos que tiveram seus modos de ação elucidados. Há maiores detalhes em relação às funções e/ou aquelas mais prováveis e que suportam potenciais de imunogenicidade para as moléculas estudadas.

Assim, para cada molécula antigênica foram relacionados os modos de ação e funções (Quadro 4).

Quadro 4 – Mecanismo de ação de anticorpos (Atcs) vacinais nos tecidos do carrapato, origem e função (ões) das proteínas/antígenos, conforme apresentado nos estudos incluídos.

Estudo	Antígeno	Mecanismo de ação do Atc vacinal nos tecidos do parasito	Origem/Função (ões) do antígeno
RODRÍGUEZ-MALLON et al. (2015)	pPO	Mecanismos anti-pPO que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	Proteína estrutural do ribossomo e multifuncional; regulação celular.
GARCÍA-GARCÍA et al. (2000)	Bm95	Mecanismos anti-Bm95 que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	Proteína muito semelhante à Bm86. Função não identificada.
ALI et al. (2015)	BrRm-MP4	Efeito protetor de Atcs anti- BrRm-MP4 não foi elucidado.	Encontrada na glândula salivar, saliva, intestino médio, ovário. As metaloproteases, inibem a coagulação do sangue, degradam proteínas de membrana, e tem ação anti-angiogênica.
GUERRERO et al. (2014)	RmAQP1 (a) RmAQP1 (b)	Efeito protetor de Atcs anti- RmAQP1 não foi elucidado, porém parece estar relacionado a interferência no transporte eficiente da água, o que acarreta ineficiência da concentração dos componentes do sangue para a digestão no parasito.	Proteína do intestino de fêmeas ingurgitadas. Aquaporinas, originalmente chamadas de canais de água, permitem a regulação do transporte de água pela bicamada lipídica altamente hidrofóbica das membranas celulares.
CUNHA et al. (2012)	rBm86-CG	A formulação da vacina ou polimorfismos do hospedeiro causaram menor eficácia dos Atcs rBm86-CG; pouca interferência da	Proteína presente no intestino médio. Função não identificada.

continuação

		estrutura da molécula antigênica foi prevista.	
ANDREOTTI et al. (2012)	rRmLTI**	Mecanismos anti-rRmTI que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	Essa tripsina é expressa em larvas. Importante para funções fisiológicas, mas que não foram determinadas.
ANDREOTTI, (2007)	BmTI-A**	Ação anticalicreína e inibição da elastase de neutrófilos, durante a alimentação do parasito, que interferem na coagulação e inibição de defesa; são os mecanismos mais prováveis devidos aos anticorpos anti-BmTI-A.	Peptídeo sintético. Este fragmento de DNA inibidor de tripsina está presente nas fases iniciais de desenvolvimento do parasito.
ANDREOTTI et al. (2002)	BmTIs**	Mecanismos anti-BmTIs que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	Tripsina, serino protease, presente na hemolinfa de larvas e importante para o desenvolvimento nesta fase.
PATARROYO et al. (2002)	SBm7462 SBm 4912 SBm19733	Mecanismos anti-Atcs que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	Proteínas sintéticas derivadas da Bm86. Funções não identificadas.
ALMAZÁN et al. (2012)	EF1a-SP1a BM95-SP1a UBQ-SP1a SUB- MSP1a	Mecanismos anti-Atcs que exerceram o efeito protetor não foram elucidados, porém os resultados sugerem que a vacinação com os esses antígenos tem diferentes efeitos sobre a biologia carrapato.	SUB – presente na gl. salivar, intestino, tecidos reprodutivos e embrionários*, ação no desenvolvimento embrionário e resposta imune inata. Proteína Ubiquitina-UBQ, presente nas células é uma proteína que regula outras proteínas. Proteína Bm95 – presente no intestino médio; função não identificada. EF1a –

continua

			<p>proteína de síntese proteica nos ribossomos.</p> <p>MSP1a- proteína de superfície oriunda de <i>A. marginale</i> que expõe peptídeos imunogênicos.</p>
MERINO et al. (2011)	SUB	Mecanismos anti-Atcs que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	<p>Proteína subolesina - SUB, presente na gl. salivar, intestino, tecidos reprodutivos e embrionários*, ação no desenvolvimento embrionário e resposta imune inata.</p>
HAJDUSEK et al. (2010)	RmFER2	Os anticorpos se ligaram à FER2 no interior das células do intestino do parasito e impediram a montagem e / ou ação da FER2. Isto pode levar ao processamento e liberação incorretos de ferro das células. Podem interferir na estabilidade da FER2 na hemolinfa e evitar o transporte de ferro nos tecidos periféricos. A precipitação incorreta de proteínas e anticorpos e / ou eliminação do fluido podem afetar negativamente a alimentação e fertilidade. Precisa-se elucidar melhor o efeito protetor de anticorpos anti-FER2 hospedeiras.	<p>FER2 é proteína transportadora principal de ferro não-heme entre o intestino carrapato e tecidos, proporcionando ferro suficiente para ovos.</p>
ALMAZÁN et al. (2010)	UBQ; SUB	Os anticorpos anti-UBQ não foram eficazes, fato que pode refletir auto-tolerância para uma molécula altamente	<p>SUB – conforme indicações anteriores. Proteína Ubiquitina- UBQ, presente nas células</p>

continua

conclusão

		conservada em eucariotos. Já a baixa produção de anticorpos anti-SUB pode ter sido a problemas relacionados a estabilidade dos antígenos na formulação da vacina. Mecanismos anti-Atcs que exerceram o efeito protetor não foram elucidados.	é uma proteína que regula outras proteínas.
--	--	--	---

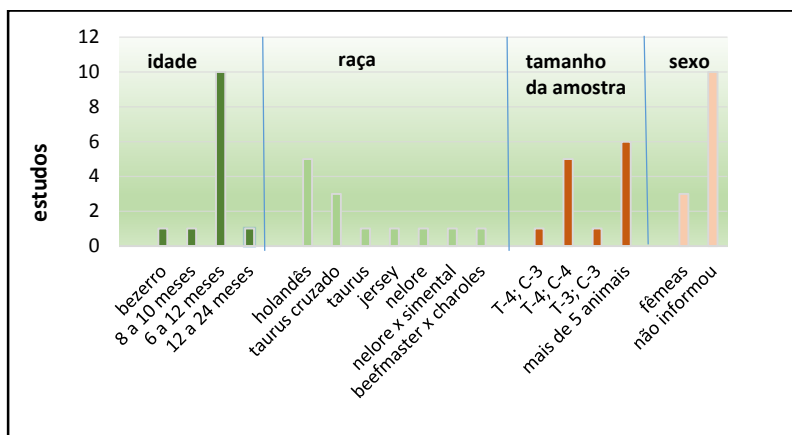
*de la Fuente et al. (2008); **inibidores de tripsina pertencentes à família Kunitz BPTI (SASAKI e TANAKA, 2008).

7.3 Qualidade metodológica dos estudos incluídos

A coleta de dados dos estudos incluídos e um fichamento próprio embasaram a avaliação metodológica.

Diante da avaliação dos dados coletados, todos os estudos apresentaram plausibilidade de viés e um possível enfraquecimento da confiança nos resultados por um ou mais critérios de avaliação não terem sido encontrados/adequados, classificando-se, assim, como de moderado a alto risco de viés de seleção, desempenho e informação (HIGGINS e GREEN, 2011).

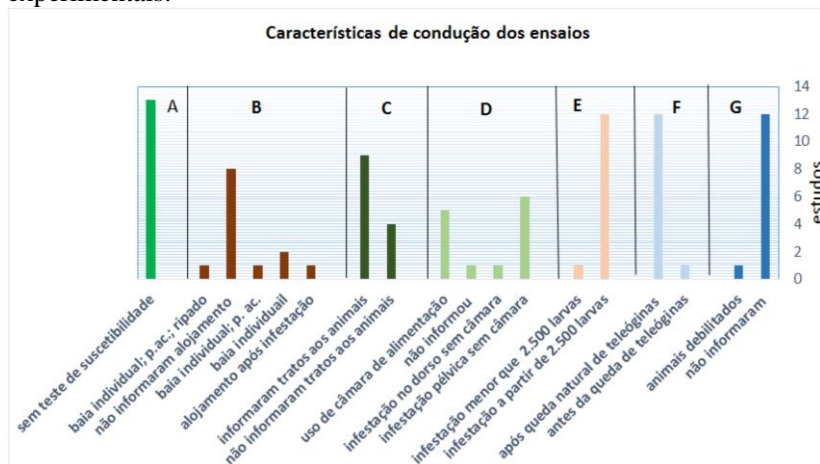
Figura 2- Características apresentadas pelos 13 estudos, após avaliação da qualidade metodológica, para a alocação dos bovinos testados.



Onde T e C referem-se a animais dos grupos tratados e dos grupos controle, respectivamente, bem como 3 e 4 ao número de animais nesses grupos.

Em relação a idade, não foi possível identificar se os animais das categorias 12 a 24 meses, bezerro, e 8 a 10 meses foram pareados; nos outros 10 estudos houve paridade e as idades estiveram no intervalo de 6 a 12 meses. Em relação a distribuição dos animais nos grupos controle e tratamento, os estudos que testaram mais de cinco animais, conforme Brasil (1997), tiveram a quantidade pareada entre os grupos testados. Quanto o pareamento do sexo dos animais, não foi possível identificar se houve pareamento entre 10 estudos. Em todos os estudos houve pareamento de raça entre os grupos de animais.

Figura 3- Características apresentadas pelos 13 estudos, após avaliação da qualidade metodológica, para critérios de condução de ensaios experimentais.



Divisões e letras referem-se a: A-teste de suscetibilidade ao carrapato; B-tipo de alojamento; C- tratos com animais; D- tipo de infestação; E- grau de infestação por larvas; F-coletas de teleóginas; G- estado de saúde dos animais testados; p.ac. indica à prova de ácaros.

7.4 Resultados da meta-análise

Os tamanhos de efeitos reportados nos experimentos incluídos, na presente revisão, variaram de -1,89 a 17,94 (g de Hedges: média \pm desvio-padrão = $2,51 \pm 3,56$). O tamanho de efeito acumulado foi positivo e estimado em 1,98 (intervalo de confiança de 95%: $\pm 0,94$; graus de liberdade = 9; $t = 4,81$; $p = 0,001$). O T^2 foi estimado em 2,57, sendo que cerca de 80,86% dessa heterogeneidade entre os tamanhos de efeitos é passível de explicação por moderadores (i.e. a maior parte dessa heterogeneidade é devida a diferenças reais entre os tamanhos de efeito do que a erros amostrais). Houve uma quantidade similar de estudos precisos (maiores pesos na estimativa do tamanho de efeito acumulado) que tanto detectaram ou não efeito da vacinação (Figura 4).

O tamanho de cada quadrado indica o peso de cada tamanho de efeito para o cálculo do tamanho de efeito acumulado (losango preto). Linhas horizontais indicam o intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}) de cada tamanho de efeito. A altura do losango indica o tamanho de efeito acumulado e sua largura indica o IC_{95%} estimado por variância robusta. A

linha vertical pontilhada indica tamanho de efeito igual a zero. Tamanhos de efeitos positivos (i.e. os quais o $IC_{95\%}$ não inclui o zero) estão em cinza. As variáveis do gráfico são: (i) Carga: número de fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas coletadas; (ii) Peso das fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas coletadas; (iii) Ovi: ovipostura das fêmeas coletadas; e (iv) Fert: fertilidade dos ovos postos pelas fêmeas.

A análise de sensibilidade indicou que a escolha de diferentes valores de p para a estimativa dos pesos apresenta baixo impacto sobre as estimativas dos parâmetros (Tabela 3). As análises de viés de publicação indicam que os resultados são robustos ao viés de publicação, mesmo considerando o pequeno número de estudos incluídos na presente revisão. O número a prova de falhas de Rosenthal indicou que são necessários 175 estudos com tamanhos de efeitos iguais a zero para alterar a significância observada (i.e. o valor de p) para acima de 5%. Já o procedimento de "apara e preenche" indicou que foram omitidos cerca de quatro estudos (erro-padrão = 2,02 estudos), mas a inclusão desses estudos potencialmente omitidos não alteraria substancialmente a estimativa do tamanho de efeito acumulado (procedimento "apara e preenche": g de Hedges \pm IC_{95%} = $1,24 \pm 0,78$; $p = 0,002$).

Tabela 3- Análise de sensibilidade para avaliar o impacto de diferentes valores de correlação entre os tamanhos de efeitos (ρ) sobre as estimativas do tamanho de efeito acumulado (g de Hedges), o erro-padrão do g e do T^2 .

ρ	g	EP	T^2
0	1,98	0,41	2,54
0,2	1,98	0,41	2,55
0,4	1,98	0,41	2,56
0,6	1,98	0,41	2,57
0,8	1,98	0,41	2,58
1	1,98	0,41	2,58

8 DISCUSSÃO

Os testes desafio que fazem uso de moléculas antigênicas para desenvolvimento de vacinas que controlem o carrapato *R. microplus* buscam determinar se elas têm ou não potencial para esse fim desejado, bem como qual seria esse potencial. A proteína vacinal Bm86, de uso comercial para controle dessa espécie de carrapato, tem eficácia variável nos países da América Latina e não elimina a dependência de agentes químicos para controle do parasito (GUERRERO; MILLER; LEÓN, 2012).

Os ensaios estudados nessa revisão sistemática apresentaram grande variação em relação a eficácia de moléculas antigênicas para controle desse parasito (Tabela 2), e avaliaram antígenos ocultos, concomitantes a infestações controladas em animais de centros de pesquisa, para os quais, e para nenhum deles, houve efeito “knockdown”¹ sobre os carrapatos. Os antígenos apresentaram, segundo autores dos estudos, potencial ou para controle conjunto, com diferentes moléculas antigênicas ou para controle por uma molécula vacinal integrada ao uso de outros métodos de controle. Apenas um antígeno demonstrou potencial para amplo espectro de ação sobre diferentes espécies de carrapato, como o caso da proteína multifuncional pPO; característica muito favorável para continuidade de testes dos seus efeitos, experimentalmente.

Esses ensaios, após a avaliação da qualidade metodológica, conforme os critérios estabelecidos na revisão, apresentaram plausibilidade de viés e um possível enfraquecimento da confiança nos resultados (Figuras 2 e 3), por um ou mais critérios de avaliação não terem sido encontrados/adequados, classificando-se, assim, como de moderado a alto risco de viés, conforme Higgins e Green (2011). Além do risco de viés apresentado, houve uma grande variabilidade na forma de conduzir os ensaios (Quadro 2), bem como houve ausência de réplicas amostrais (estudos), o que levou a apenas uma avaliação de efeito, que indicou se a prática de vacinação sobre o controle do carrapato é benéfica; tal hipótese foi confirmada com o uso da meta-análise, pois a medida de efeito resumo (valor acumulado dos tamanhos de efeito das variáveis estudadas), estimada por regressão (EVR), foi maior do que zero (Figura 4). Através da meta-análise detectou-se que há diferenças entre os estudos, porém não

¹ Efeito knockdown: choque, rápida paralisia no agente que sofreu a ação.

foi possível indicar o melhor antígeno, pois para isso, deveria haver mais réplicas de diferentes antígenos sobre uma mesma estirpe e de um mesmo antígeno sobre diferentes estirpes, sob conduções experimentais similares. Sob essa ótica, a revisão sistemática abriu caminhos para avaliações futuras com meta-análise, caso se invista em maior padronização de ensaios e haja réplicas de estudos de antígenos vacinais sobre estirpes específicas. Se assim for, com o passar do tempo, será possível concluir por meio de estudos primários de boa qualidade e detecção de diferença entre eles, qual antígeno protetor seria mais indicado para o controle de dada estirpe. Vale ressaltar que as revisões recuperadas no processo de busca de artigos não foram sistemáticas e que apenas uma abordou questões de delineamento e condução experimental vinculadas a eficácia, conforme apresentaram Cunha et al. (2013).

Existem alguns critérios convencionados para se avaliar a qualidade de um antígeno vacinal, e, dentre eles, tem relevância a capacidade imunogênica do antígeno em produzir anticorpos específicos e de memória. Como todos os antígenos estudados nessa revisão são ocultos, corroboram a afirmação de Nuttall (2006) de que induzem imunoglobulinas específicas (Tabela 1). Como a maior parte deles não teve a indicação da especificidade de classe, muito provavelmente se trata de imunoglobulinas de reação alérgica como as da classe de IgE, pois vacinas provocam tais reações em bovinos, conforme Tizard (2014) e Abbas (2011); tais reações possivelmente foram acionadas enquanto houve o desafio dos antígenos vacinais. Conforme esses mesmos autores, a classe de imunoglobulina IgG faz parte de anticorpos que desenvolvem memória imunogênica, a qual favorece nos desafios seguintes aos mesmos antígenos. Os anticorpos vacinais, pertencentes a esta classe, foram em número de sete, dentre os ensaios realizados e encontrados nessa revisão (Tabela 1). A vantagem de antígenos ocultos serem de memória está no fato de poderem acionar mais rapidamente a resposta imune, isto é, o pico de anticorpos vacinais que controla a infestação no animal poderá ser alcançado e assim causar menos perdas de produção e maior proteção contra o carrapato, num menor espaço de tempo. Desse modo, esses sete antígenos tiveram maior potencial para proteção vacinal a curto espaço de tempo em relação aos demais.

Há, porém, um fator a ser considerado em adição a esta produção de anticorpos de memória, e que pode desencadear uma resposta imune mais adequada como é o caso da localização/topologia do antígeno vacinal na superfície da célula originária, atualmente considerada um dos principais determinantes da imunogenicidade (FLOWER, 2008).

Considerando, assim, as vantagens dos antígenos membranares, apenas quatro deles (Tabela 1), têm essa localização somada a indução de IgG. Por essas características somadas a eficácia geral (Tabela 2), o antígeno SBm7462 foi o mais promissor. Lembrando-se que o fato de ser de membrana sugere bom potencial imunogênico, por isso se faz necessário mais estudos confirmatórios de tais características sobre esses antígenos.

Em relação a práticas de avaliação, a correlação entre anticorpos vacinais e seus efeitos sobre os parâmetros biológicos do carrapato tem sido relevantes para indicar bom potencial imunogênico de um antígeno candidato; Lodos et al. (2000), consideraram e a propuseram como parte do conjunto de avaliações de um antígeno teste. Dentre os estudos da presente revisão, apenas quatro correlacionaram anticorpos específicos e seus efeitos sobre o carrapato (ALI et al., 2015; CUNHA et al., 2012; ANDREOTTI et al., 2012; ALMAZAN et al., 2010). A avaliação por correlação favorece a clareza dos efeitos dos anticorpos vacinais sobre a biologia o carrapato, dessa forma, os quatro estudos ora citados permitiram melhores deduções de efeito imunogênico.

Adicionalmente, a condução dos experimentos nos estudos/ensaios incluídos apresentou variações nas formas de alojamento dos animais; nos procedimentos de infestações por larvas (Quadros 1 e 2), bem como nos procedimentos para aferição de parâmetros pós coleta de teleóginas (Quadro 1). A falta de protocolo considerado padrão para essas fases dos ensaios (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015; SCHETTERS et al., 2016), provavelmente, explica tais variações metodológicas. Apesar dessa falta de padrão, os protocolos contidos em Amaral (1993) foram parcialmente seguidos por alguns estudos dessa revisão e se referem aos ensaios que identificaram o tipo de alojamento (Quadro 2); os outros ensaios muito provavelmente seguiram protocolos laboratoriais próprios e menos similares ao previsto por esse autor. Essas diferenças nas conduções podem dificultar comparações e interpretações entre diferentes laboratórios e uma padronização de guias de ensaios poderia reduzir e/ou prevenir riscos de vieses e levar a resultados mais acurados nas análises realizadas.

Algumas diferenças de conduções realizadas (Quadro 2) e que a partir delas é possível prever/supor algumas consequências são: (i) nos estudos que não informaram o tipo de alojamento e/ou característica de pasto utilizado, os animais podem ter corrido o risco de terem contraído infestações naturais, o que pode ter interferido no resultado final da eficácia do antígeno vacinal; (ii) o uso de câmara de alimentação, benéfico para verificar o desempenho das larvas na relação hospedeiro-

parasito, compromete a autolimpeza e outras formas de proteção natural contra o parasito e, assim, distancia de uma aferição mais próxima da realidade de campo. Outra questão a se considerar (Quadro 1) é a forma de infestação escolhida pelos estudos, que não levaram em conta uma primo infestação anterior a do tratamento, que é importante para selecionar animais, quanto a resistência ao carrapato, para posterior alocação mais justa nas repetições, conforme preconiza a Portaria, MAPA, nº 48, (BRASIL, 1997) para testes com carrapaticidas; e que foi base para aferir qualidade metodológica nesta revisão. Em decorrência da não observância a esse critério, ficou difícil saber se o efeito sobre o parasito se deveu pela produção exacerbada de anticorpos vacinais, por se tratar de animais mais sensíveis ou se seria realmente a média mais fiel correspondente a cada raça testada. Caso houvesse carrapatos em suas fases de vidas desde a primeira injeção (tratamento), poder-se-ia deduzir como os anticorpos vacinais, em suas concentrações até alcançarem o pico de produção, agem sobre essas fases.

Ainda, em todos os estudos que realizaram testes de significância estatística, (Quadro 3), pode ter ocorrido interferência dos procedimentos de infestações por larvas os quais e a partir deles também decorrem os efeitos sobre os parâmetros biológicos do carrapato (AMARAL, 1993; BRASIL, 1997). É importante considerar ainda que a coleta de fêmeas ingurgitadas com peso não favorável ao controle, entre 180-226 mg de peso (BENNETT; 1974) envolveu mais de 50% dos ensaios estudados. Esses dados demonstram que o principal efeito da maioria dos antígenos sobre as eficácias (Tabela 2) não foi referente a redução do peso das fêmeas ingurgitadas, fato que acarreta em menores chances desses antígenos fazerem jus ao controle de infestações das pastagens de forma progressiva, em vacinações sucessivas, pois, de acordo com Furlong (2002); Friesen e Kaufman (2009), o peso de fêmeas ingurgitadas e a quantidade de ovos postos são proporcionais. Esse controle de infestações nas pastagens, resultante do efeito do antígeno vacinal sobre a reprodução do parasito, é apontado por pesquisadores como o mais relevante dentre os efeitos das vacinas sobre os parâmetros biológicos do carrapato (COBON et al., 1995; PATARROYO et al., 2002).

A eficácia geral tem sido outro critério para avaliar o potencial de controle de carga parasitária na pastagem e no rebanho, e há uma aceitação pela pesquisa de que quando o resultado é maior que 50%, é suficiente para reduzir larvas nas gerações seguintes (LABARTA et al., 1996; LODOS et al., 2000; DE LA FUENTE; KOCAN, 2003). Nessa revisão, 14 antígenos apresentaram eficácia mediana (Tabela 2) e maior

parte dos autores, oito estudos, usou a fórmula que avalia os coeficientes de redução de teleóginas, massa de ovo e fertilidade dos ovos (Tabela 2), que é a mais aceita atualmente (FUENTE; CONTRERAS, 2015) e foi estabelecida por Canales et al. (1997). As eficácias medianas e altas apresentam indícios de que os antígenos são promissores para continuarem ser testados para formulação de vacinas. Para avaliar esse potencial, tem sido considerado a necessidade de estabelecer um método universal para calcular a eficácia geral (E) de um antígeno estudado, posto que padronizará os resultados e comparações entre eficácias determinadas por diferentes laboratórios para diferentes antígenos (RODRIGUEZ-MALLON, 2016). Nesse sentido, a fórmula estabelecida por Canales et al. (1997) mostra-se a mais indicada, mas a nova fórmula utilizada por Rodríguez-Mallon et al. (2015), que testaram a proteína pPO (Tabela 2), e que tem como diferencial um maior detalhamento do quantitativo do controle sobre os parâmetros avaliados em relação a primeira, também possibilita segurança, abrangência e representatividade.

O cálculo mais aceito para aferir eficácia contribui, adicionalmente, ao conhecimento das funções e modo de ação dos anticorpos vacinais, para tornar mais claro do porquê do potencial antigênico de dado antígeno. Porém, anticorpos vacinais com modos de ação elucidados, nos ensaios dessa revisão, foram muito poucos (Quadro 4). Apesar desses resultados, foi possível fazer uma analogia e vincular o modo de ação à eficácia para a estirpe Media Joya, que foi sensível a ação dos anticorpos vacinais da proteína ferritina 2 (RmFER2), os quais agiram na regulação do excesso de íons de ferro do sangue ingerido pelo parasito. Essa proteína resultou numa eficácia de 64% (Tabela 2), teve maior ação sobre fêmeas ingurgitadas e o peso dessas foi significativamente menor em relação às do grupo controle. Tal analogia vem ao encontro da afirmação de pesquisadores, como de la Fuente e Kocan (2014), que a Ferritina 2 se trata de uma molécula antigênica promissora para proteção contra *R. microplus*. Outra analogia possível foi em relação a estirpe Campo Grande, sensível a anticorpos vacinais da proteína aquaporina (RmAQP1), que regularam a quantidade de água, ingerida pelo parasito durante a espoliação, e levaram a uma eficácia de 68% e 75% (Tabela 2). Esses anticorpos agiram mais sobre a fertilidade de ovos postos, porém não houve diferença de peso de fêmeas do grupo tratamento e grupo controle. Apenas essas duas analogias foram possíveis, pois, não se conhecendo as diferenças de respostas, no parasito, às ações dos anticorpos vacinais, ficou difícil indicar comparativamente o que, de fato, tornaram os antígenos mais e menos eficazes entre si.

Vale ressaltar que, além dos fatores ora apresentados, as raças desempenham um papel importante em relação às respostas de defesa imunológica para molécula antigênica estudada. Raças taurinas são mais sensíveis às infestações pela espécie de carrapato *R. microplus* (GONZALEZ, 2003). Cerca de 50% dos testes utilizaram raças mestiças (Quadro 2); a vantagem dessa prática é que se consegue, de certo modo, conhecer o efeito de dado antígeno sobre diferentes raças, ao mesmo tempo, em relação a produção de anticorpos vacinais; por outro lado não se tem uma avaliação precisa de qual raça expressa maior imunidade contra dado antígeno, visto que, as raças expressam imunidade de forma diferente, como aponta Cunha et al. (2013).

Outra fonte de variação, também intrínseca ao hospedeiro e que repercute no efeito do antígeno sobre o sistema imune é a idade. Por isso quando se realiza testes em estábulos, para avaliar eficácia de tratamentos sobre carrapatos, indica-se animais de seis meses a um ano de idade (AMARAL, 1993), e essas idades vêm sendo aceitas para a pesquisa de vacinas e embasaram alocação de animais nos ensaios dessa revisão, exceto em dois casos dela (RODRÍGUEZ-MALLON et al., 2015; e ALI et al., 2015), os quais testaram animais com 24 e 18 meses respectivamente, podendo terem contribuído para alteração nos efeitos vacinais sobre eles e no carrapato. De acordo com Spinosa (2011), tanto os animais muito jovens (com menos de 6 meses) quanto os mais velhos podem ter uma imunidade celular e humoral diminuídas.

Os dados contidos nos estudos incluídos por essa revisão não permitiram realizar uma análise comparativa precisa de elementos, que de forma ordenada, distinguissem antígenos altamente eficazes. Por isso, duas questões chaves ficam em aberto: (i) os critérios/elementos que, seguramente, poderiam ser indicadores de alta eficácia; e (ii) como esses critérios/elementos, indicadores de qualidade, poderiam ser padronizados. Porém, nessa revisão, foi possível elencar pelo menos três elementos, que a pesquisa atual tem aceitado como favoráveis a boa antigenicidade molecular de antígenos candidatos: (1) localização do antígeno na membrana, (2) capacidade de indução de anticorpos de memória, (3) capacidade de bloqueio/interferência da reprodução de fêmeas ingurgitadas.

9 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesta revisão sistemática da literatura permitiram concluir:

1. Vacinar bovinos com os antígenos candidatos estudados oferece algum benefício para controle do *R. microplus*, de acordo com a meta-análise realizada.
2. Nos três países, Brasil, Cuba e México, existe pelo menos um antígeno de uma estirpe nativa com eficácia acima de 60% (mediana), dentre os estudos incluídos, entre os anos de 2002 e 2015. Trata-se de moléculas aptas a serem testadas e estudadas quanto ao modo de ação e função, a fim de se obter maior clareza dos fatores determinantes de seus efeitos.
3. Não existem critérios padronizados para classificar antígenos altamente eficazes. E por isso foi possível apenas comparações de antígenos com potenciais pouco ou muito pouco específicos de antigenicidade.
4. Revisão sistemática de literatura pode ser uma ferramenta muito útil para avaliar a qualidade de antígenos vacinais contra *R. microplus*, caso sejam feitas padronizações de critérios de qualidade para ensaios e moléculas, bem como haja réplicas de estudos para mesmos antígenos e diferentes estirpes e vice-versa.
5. As conduções dos experimentos mostraram-se críticas no quesito infestação de larvas para aferição mais acurada dos efeitos dos antígenos sobre o hospedeiro e carrapato, pois em nenhum ensaio houve primo infestação seletiva de animais resistentes ao carrapato.
6. Apesar dos potenciais de antigenicidade serem pouco específicos, as evidências encontradas nessa revisão permitiram selecionar antígenos, potencialmente, mais promissores, tais como: RmFER2 e RmAQP1, SBm7462, SUB-MSP1a, pPO, Bm95 e rBrRm-MP4.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**, Elsevier Brasil. 7. ed., p. 109-138, 2011.

ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6–20, 2014.

ABID, ALI. et al. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. **Veterinary Parasitology**, v.207, p.107–114, 2015.

ALMAZÁN, C. et al. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. **Parasitology Research**, v.106, p.471–479, 2010.

ALMAZÁN, C. et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. **Vaccine**, v.30, p.265– 272, 2012.

AMARAL, M. A. Z. Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 148-154, 2011.

AMARAL, N. K. Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) (acari ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, p.144-151, 1993.

AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto, SP. Holos. 1 ed., 2002, 156 p.

ANDREOTTI, R. et al. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v.2, p.557– 563, 2002.

ANDREOTTI, R. A synthetic BmTI n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. **Experimental Parasitology**, v.116, p.66–70, 2007

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil.** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p.

ANDREOTTI, R. et al. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p. 127-133, 2011.

ANDREOTTI, R. et al. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. **Vaccine**, v.30, p.6678– 6685, 2012.

APANASKEVICH, A. D; OLIVER, J. H. JR. Life cycles and natural history of ticks. In: **Biology of Ticks**. UK. Oxford University Press. 2 ed. vol. 1, 2014.

ATHANASSOF, N. Manual do criador de bovinos: a fazenda de criar raças e tipos, alimentação, criação, engorda, produção de leite, trabalho, higiene e moléstias. 6. ed. rev. ampl. São Paulo: (Biblioteca Agronômica Melhoramentos, 1), 1957, 818 p.

BALASHOV, Y. S. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. **Annual Reviews**, v. 29, p. 137-156, 1984.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Experimental and Applied Acarology**, v.28, p.55-68, 2002.

BOWMAN, A. S. et al. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, p.388–395, 1996.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.

BORENSTEIN, M. et al. **Introduction to meta-analysis**. John Wiley & Sons, Ltd. 2009, 413p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico, elaborado pelo Departamento de Defesa Animal a ser observado na produção, no controle e no emprego de antiparasitários de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, Brasília 16 de maio de 1997. Seção 1.

BRITO, L. G. et al. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Embrapa Rondônia: Porto Velho, **Documentos 104**, 2006. 21p.

BRUM J.G.W.; GONZALES J. C.; PETRUZZI, M. A. Postura e eclosão de *Boophilus microplus* em diferentes localizações geográficas do RS, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 37(6), p. 581-587, 1985.

CANALES, M. et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. **Vaccine**, v. 15, n. 4, p. 414-422, 1997.

CANALES, M. et al. Protective efficacy of bacterial membranes containing surface exposed Bm95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. **Vaccine**, v.27, p.7244–7248, 2009.

CASTRO, A. A. A pergunta da pesquisa. In: Atallah AN, Castro, A.A. Medicina baseada em evidências: fundamentos da pesquisa clínica. São Paulo: Lemos-Editorial; 1998. Disponível em: URL: <http://www.evidencias.com/pergunta.pdf>, 2015.

Centre for Reviews and Dissemination. Published by CRD, University of York, 2009. Prepared and printed by: York Publishing Services Ltd. Disponível em:< www.yps-publishing.co.uk>

Collaboration for Environmental Evidence (CEE). Guidelines for Systematic Review and Evidence Synthesis in Environmental Management. Version 4.2, Environmental Evidence. Disponível: <www.environmentalevidence.org/Documents/Guidelines/Guidelines4.2.pdf>.

CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v.114, p.40–46, 2006.

COBON, G. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. In: De la Fuente, J. (Ed.), **Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick**. Elfos Scientae, La Habana, p. 163–176, 1995.

COOPER, H. **Research synthesis and meta-analysis: A step-by-step approach**. 3 ed. Thousand Oaks, CA: Sage, 2010.

CORLEY, S.W. et al. Mutation in the Rm β AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2013

CONTRERAS, M. et al. Vaccinomics Approach to Tick Vaccine Development, Chapter 19. In: **Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases**. Sunil Thomas (ed.), Business Media New York, 2016.

CUNHA, R. C. et al. Imunoproteção de bovinos contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com antígeno recombinante Bm86 Campo Grande. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 21, n. 3, p. 254-262, 2012.

CUNHA, R. C. et al. Calculation of the efficacy of vaccines against tick infestations on cattle, **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 22, n.4, p. 571-578, 2013.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p.1013-1019, 1998.

DE LA FUENTE, J. et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GavacTM against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.16, p.366–373, 1998.

DE LA FUENTE, J. et al. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, v.15, p.143–148, 1999.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review Vaccines*, v.2, p.583–93, 2003.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, v.28, p.275–283, 2006.

DE LA FUENTE, J. et al. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood digestion and reproduction. *Vaccine*, v.24, p.4082–4095, 2006.

DE LA FUENTE, J. et al. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, v.8, p.23–28, 2007.

DE LA FUENTE, J. et al. Targeting the Tick-Pathogen Interface for Novel Control Strategies. *Frontiers Bioscience*, v.13, p.6947–6956, 2008.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Development of vaccines for control of tick infestations and interruption of pathogen transmission. In: *Biology of Ticks*. U K. Oxford University Press. 2 ed., vol. 1, cap. 12, 2014.

DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Review of Vaccines*, v. 14, n.10, p.1367–1376, 2015.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, v.71, p.77–97, 1997.

DINNES J. et al. A methodological review of how heterogeneity has been examined in systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Health Technology Assessment*, v.9, n.12, p.1–113, 2005.

DUVAL, S. J., TWEEDIE, R. L. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. **Biometrics**, v.56: 455–463, 2000.

EVANS, D. Systematic reviews of nursing research. **Intensive and Critical Care Nurs**, v.17, n.1, p.51-57, 2001.

FAO. World Livestock 2011 - Livestock in food security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2011. [Online] Available from: <http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf> [Accessed on 10th July, 2016]

FANG, Q. Q; PUNG, O. J. In: **Recent Advances in Entomological Research**. T. Liu et al. (eds.), Berlin Heidelberg: Higher Education Press, 2011

FARIAS N. A. R. **Diagnóstico e Controle da Tristeza Parasitária Bovina**. Editora Agropecuária, Guaíba, RS. 1995, 80p.

FARIAS N. A. R. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA F. et al. (ed.) **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Editora Varela, São Paulo. p.35-42. 2001.

FISHER, Z., TIPTON, E. Robumeta: Robust variance meta-regression. R package version 1.3, 2014.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

FLOWER, D. R. **Bioinformatics for Vaccinology**. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 2008.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v.14, p.2051 - 2088, 2009.

FRISCH, J. E. et al. Using genetics to control cattle parasites-the Rockhampt on experience. **International Journal for Parasitology**, v.30(3): p.253-264, 2000.

FRIESEN, K. J; KAUFMAN, W. R. Salivary gland degeneration and vitellogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*: surpassing a critical weight is the pre-requisite and detachment from the host is the trigger. **Journal Insect Physiology**, v. 55, p. 936-942, 2009.

FURLONG, J. Comportamento de *B. microplus* (Canestrini, 1887), e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em infestações consecutivas ou simultâneas em bovinos: análise preliminar de parâmetros Biológicos. 1990. 92 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1990.

FURLONG, J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária**, UFMG. v.8, p.49-61, 1993.

FURLONG, J. et al. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* infestation on feed intake and milk yield of Holstein Zebu crossbred cows. Campo Grande: Proceedings of the XV Panamerican Congress on Veterinary; 1996.

FURLONG, J. et al. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Ciência Animal**, v.39, n.4, p.213-217, 2002.

FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções**. Embrapa gado de leite, Juiz de Fora, 2005, 65 p.

FURLONG, J. et al. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **Hora Veterinária**, v.159, p.1-7, 2007.

GALUN, R. **Research into alternative arthropod control measures against livestock pests (Part 1)**. K.C. Thompson (Editor), CIAT, Colombia, 13, p. 155-161, 1978.

GARCÍA-GARCÍA. J. C.; et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental and Applied Acarology**, v.23, p. 883-895, 1999.

GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.18, p.2275-2287, 2000.

GASPARIN et al. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38(5), p. 453-459, 2007.

GIL, A. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2009.

GLASS, G.V. Primary, secondary and meta-analysis of research. **Educational Researcher**, v.5, p.3-8, 1976.

GLÓRIA, M. A. et al. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *B. microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticida em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 79-84, 1993.

GRAF, J. F. et al. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v.129, s.427-S442, 2004.

GOMES, A. O *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R.H. & SCHENK, M.A.M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte. p.10-46, 1998.

GOMES, A. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.41(8), p. 447-452, 2011.

GONZALES, J. C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão histórica e conceitual. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 23-28, 2002.

GONZALES, J. C. **O Controle do Carrapato do Boi**. 3. ed. Universidade de Passo Fundo, RS. 2003, 128p.

GRISI, L et al., Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F. D; MILLER, R. J; de LEÓN, A. A. P. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? **International Journal for Parasitology**, v. 42, p.421-427, 2012.

GUERRERO, F. D. et al. *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v.7, p.475, 2014.

GUERRERO, F.D. et al: Acaricide research and development, resistance and resistance monitoring. In: **Biology of ticks v.2**. 2. ed. Edited by Sonenshine, D.E., Roe, R. M. New York, Ny: Oxford University Press. p.353-381, 2014.

GUIZZO, M. G. et al. Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40(1), 2012.

HAJDUSEK et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v.28, p. 2993–2998, 2010.

HEDGES, L. V.; TIPTON, E.; JOHNSON, M. C. Robust variance estimation in meta-regression with dependent effect size estimates. **Research Synthesis Methods**, v.1: 39–65, 2010.

HIGGINS, J. P. T; GREEN. S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochrane-handbook.org. <<http://training.cochrane.org/handbook>>

HORN, F. et al. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.384, p.68–73, 2000.

HOVIUS, J. W. R. et al. Salivating for knowledge: Potential pharmacological agents in tick saliva. **PLoS Medicine**, v.5, p.202–208, 2008.

HUNTER, J. E., SCHMIDT, F.L. **Methods of Meta-Analysis: Correcting Error and Bias in Research Findings**. 2. ed. Beverly Hills. 2004.

HUBERT, P. et al. Single-spanning transmembrane domains in cell growth and cell–cell interactions. **Cell Adhesion Migration**, v.4, 313–324, 2010.

IMAMURA, S. et al. A serine proteinase inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as na anti-tick vaccine. **Vaccine**, v. 23, p.1301-1311, 2005.

JACKSON, L. A., OPDEBEECK, J.P. Humoral immune responses of Hereford cattle vaccinated with midgut antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Parasite Immunology**, v.12, p.141–151, 1990.

JOHNSTON, L. A. et al. Immunisation of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effect of induced immunity on tick population. **International Journal for Parasitology**, v.16, p.27–34, 1986.

JONSSON, N. N. et al. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasite Immunology**, v. 36, p.553–559, 2014.

JUNCADELLA, I. J. ANGUITA, J. The Immunosuppressive Tick Salivary Protein, Salp15. In: Pathogen derived immunomodulatory molecules, chapter 10, 2009.

KASAI, N. et al. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) em bovinos leiteiros mantidos em manejo de pastejo rotativo de capim-elefante. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p.453-458, 2000.

KESSLER, R. H.; SCHENCK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Embrapa-Cnpq, Campo Grande, 1998, 157p.

KEMP, D. H. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental and Applied Acarology**, v.7, p.43–58, 1989.

KASHINO, S. S. et al. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v.110, p.12–21, 2005.

KAZIMÍROVÁ, M. Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. **Advances in arachnology and developmental biology**, v. 12, p. 281–296, 2008.

KOCAN, K. M. et al. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. **Parasitology Research**, p. 100:1411–1415, 2007.

LABRUNA, M. B. Combate contra *R. (B.) microplus*. Cap.5. In: ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Biologia, Controle e Resistência**. Pereira. São Paulo: MedVet, 2008.

LABARTA, V. et al. Simulation of control strategies for the cattle tick *Boophilus microplus* employing vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, v.63, p.131–60, 1996.

LOW et al. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. **Parasites & Vectors**, v.8, (341), 2015.

LODOS, J. et al. A model to simulate the effect of vaccination against *Boophilus* ticks on cattle. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.315–326, 2000.

MARUYAMA, S. R. C. Antígenos salivares recombinantes de *Rhipicephalus microplus* selecionados por imunovacinologia reversa:

efeito da vacinação de bovinos no controle das infestações por carrapatos. 2012. Tese (Doutorado-Manuscrito). Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MAPHOLI, N. O et al. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 475–483, 2014.

MARITZ-OLIVIER, C. et al. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends in parasitology**, v.23, p.397–407, 2007.

MARITZ-OLIVIER, et al. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.3, 179–187, 2012.

MARTIN, T. et al. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33 (9), p.883-887, 2003.

MARTINS, J. R. et al. Partial strategic control within a herd of European breed cattle in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v.27, n.3, p.241-251, 2002.

MARTINEZ, E. Z. Meta-análise de ensaios clínicos controlados aleatorizados: aspectos quantitativos. Medicina (Ribeirão Preto), v.40(2), p.223-235, 2007. Disponível em: URL: <http://www.fmrp.usp.br/revista>

MATTIOLI, R. F. et al. Immunogenect influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos Taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. **Acta Tropica Journal**, v.75, p. 263-277, 2000.

MERLINI, L. S; YAMAMURA, M. H. A resistência do *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 aos produtos químicos. **Arquivo Brasileiro de Ciência Veterinária e Zootecnia**, UNIPAR, v.2(1), 1999.

MERINO, O. et al. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. **Vaccine**, v.29, p.2248–2254, 2011.

MERINO, O. et al. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.1-9, 2013.

MOHER, et al. (The PRISMA Group). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Medicine**, v.6, 2009.

MURRELL, A., BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

NAKAGAWA, S.; CUTHILL, C. I. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. **Biological Reviews**, v.82, 4, p.591-605, 2007.

NEVES, J. Pesquisa qualitativa: características, usos e possibilidades. **Caderno de Pesquisas em Administração**, São Paulo, v. 1, n. 3, 1996.

NUTTALL, P. A., et al. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite immunology**, v.28 (4), p.155-163, 2006.

OAKESHOTT, J. G. et al. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, v.4 (1), n.202, p.1-4, 2003.

OGIHARA, H. M.; TAYLOR, D. Life cycles and natural history of ticks. In: *Biology of Ticks*. UK. Oxford University Press. 2.ed. vol. 1, 2014

OPDEBEECK, J. P. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated antigens from the midgut of ticks. **Parasite Immunology**, v.10, p.405–410, 1988.

Organisation for Animal Health. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World. 2012.

OXMAN, A. D; GUYATT, G. H. The science of reviewing research. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.703, p.125–133, 1993.

PATARROYO, J. H. et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.88, p.163–172, 2002.

PARIZI, L. F. et al. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2009.

PENICHET, M. et al. Detection of 5m86 antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. **Parasite Immunology**, v.16, p. 493-500, 1994.

PECONICK, A. P. et al. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, v.119, p.37–43, 2008.

PEREIRA, M. C. et al. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Biologia, controle e resistência**. São Paulo: Ed. MedVet, 2008, 169p.

PIPER, E. K. et al. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, p.1074–1086, 2009.

POLANCO-ECHEVERRY, D. N.; RÍOS-OSORIO, L.A. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. **Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v.17(1), p.81-95, 2016.

PRUETT, J. H.; OLAFSON, P. U.; DAVEY, R. B. Serologically defined *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval antigens in BmLF3, a partially purified Sephacryl S-300 fraction of crude larval proteins. **Veterinary Parasitology Journal**, v. 155, p. 264-272, 2008.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201 p.128–136, 2014.

REDONDO, M. et al. Integrated control of acaricide- resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. **Experimental and Applied Acarology**, v.23, p.841–849, 1999.

RICHARDS, S. A. et al. Transmembrane proteins – Mining the cattle tick transcriptome. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.6, p.695–710, 2015.

RIEK, R.F. The cattle tick and tick fever. **Australian Veterinary Journal**, v.41, p.211–215, 1965.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, 73–88, 2003.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. et al. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.6, p.530–537, 2015.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing Anti-tick Vaccines. In: **Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases**. Sunil Thomas (ed.), New York, 2016.

RODRÍGUEZ, M. et al. High level expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast *P. pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal Biotechnology**, v.33, p.135–146, 1994.

RODRÍGUEZ, M. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology Journal**, v.57, p.339–349, 1995.

RODRIGUEZ-VALLE. M. et al. *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterisation assessment. **Parasites & Vectors**, v.8, p.7, 2015.

ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus*. Stages of life cycle of parasite against which resistance is manifest. **Journal of Parasitology**, 54 (4): 667–673, 1968.

ROCHA, U. F. **Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini)**. Jaboticabal: UNESP, 1984. 32p. (Boletim Técnico, 3).

ROSENTHAL, R. The "file drawer problem" and tolerance for null results. **Psychological Bulletin**, v.86, p.638–641, 1979.

R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.89–109, 2001.

SASAKI, S. D.; TANAKA, A.S. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.133–41, 2008.

SAUERESSIG, T. M. O carrapato e a tristeza parasitária bovina. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1995, 16p (Circular Técnica, 31).

SCHETTERS et al. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. **Parasites & Vectors**, v.9, p.105, 2016.

SPINOSA, H. S. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Guanabara Koogan. 2011. 918p.

SHELBY, L.B; VASKE, J. J. Understanding Meta-Analysis: A Review of the Methodological Literature. **Leisure Sciences**, v.30, p. 96–110, 2008

SONENSHINE, D. E. et al. Tick control: Further thoughts on a research agenda. **Trends Parasitology**, v.22(12), p.550–551, 2006.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. Life cycles and natural history of ticks. In: **Biology of Ticks**. UK. Oxford University Press. 2ed. vol. 1, 2014.

SOUZA, A.P. Controle integrado das principais parasitoses de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veteterinária**, v.13, suplemento1, p.72-79, 2004.

SOUSA, M, R. A. *Revisão Sistemática e Meta-análise de Estudos de Diagnóstico e Prognóstico: um Tutorial*. Serviço de Cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Clínica Médica da UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 2008.

SOUSA, M. R.; RIBEIRO, A.L.P. Revisão sistemática e meta-análise de estudos de diagnóstico e prognóstico: um tutorial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.92(3), p.241-251, 2009.

STEPHEN B. HULLEY. et al. **Delineando a pesquisa clínica**. Artmed Editora, 400 p. 2015.

SUDHAKAR, N.R, et al. RNA interference in parasites: prospects and pitfalls. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v.1, p.1-6, 2013.

SUAREZ, M. et al. High impact and effectiveness of Gavac™ vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. **Livestock Science**, v. 187, p.48–52, 2016.

TANNER-SMITH, E. E.; TIPTON, E. Robust variance estimation with dependent effect sizes: practical considerations including a software tutorial in Stata and SPSS. **Research Synthesis Methods**, v.5, p.13–30, 2014.

TITUS, R.G. et al. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. **Parasite Immunology**, v.28: p.131-141, 2006.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9ed. Elsevier Brasil, 2014. 568p.

TRIMNELL, A. D. et al. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine**, v.23, p.4329–4341, 2005.

TSUDA, A. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. **Vaccine**, v.19, p.4287–4296, 2001.

TURNI, C. et al. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunology**, v.24, p.355–361, 2002.

ULLMANN, A. J. et al. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Molecular Biology**, v.14 (2), p.217-222, 2005.

UTECH, K.B.; WHARTON, R.H.; KERR, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.885-895, 1978.

VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to “sialomes” and functional genomics. **Parasitology**, v.129, S83–S94, 2004.

VALLE, M. R. et al. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. **Experimental and Applied Acarology**, v.34, p.375-382, 2004.

VAN ZEE, J. P. et al. Tick genomics: the *Ixodes* genome project and beyond. **International Journal for Parasitology**, v.37, p.1297-1305, 2007.

VARGAS, M. et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac^{plus} vaccine against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. **BMC Veterinary Research**, v.6, n.43, 2010.

VAZ, J. I. S. et al. Caracterização de novos antígenos em *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.

VAZ, J. I. S.; SEIXAS, A.; MASUDA, A. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM, cap.17, 2012.

VIECHTBAUER, W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. **Journal of Statistical Software**, v.36, p.1-48, 2010.

VIECHTBAUER [2010]. R package version 3.0.1. 2013. Disponível em: URL: <http://CRAN.Rproject.org/package>.

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. **Parasitology**, v.109, p.525–530, 1994.

WHARTON, R. H. et al. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and heritability. **Australian Journal Agricultural Research**, v.21, p.163-181, 1970.

WHARTON, R. H. The current states and prospects for the control of ixodes ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. **Bulletin - Office international des épizooties**, Paris, v. 81, p. 65-85, 1974.

WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. **International Journal Parasitology**, v. 17, p.671–677, 1987.

WILLADSEN, P; KEMP, D.H. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. **Parasitology Today**, v.4, p.196–198, 1988.

WILLADSEN, P. et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v.143, p.1346–1351, 1989.

WILLADSEN P. Perspectives for subunit vaccines for the control of ticks. **Parassitologia**, v. 32 (1), p.195–200, 1990.

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology Today**, v. 15(7), p. 258-262, 1999.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v.129, s.367–387, 2004.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138 (1-2), p. 161-168, 2006.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. In: Bowman AS, Patricia A.N. **Ticks: Biology, Disease and Control**, eds. Nuttall. Cambridge: Cambridge University Press. p. 424-446, 2008a.

WILLADSEN, P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? **Trends Parasitology**, v.24, p.164–167, 2008b.

WIKEL, S. K. Immunological control of hematophagous arthropod vectors: Utilization of novel antigens. **Veterinary Parasitology**, v.29 (2–3), p.235–264, 1988.

WIKEL, S. K.; WHELEN, A. C. Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and Tick-induced host immunosuppression. **Veterinary Parasitology**, v.20, p.149-174, 1996.

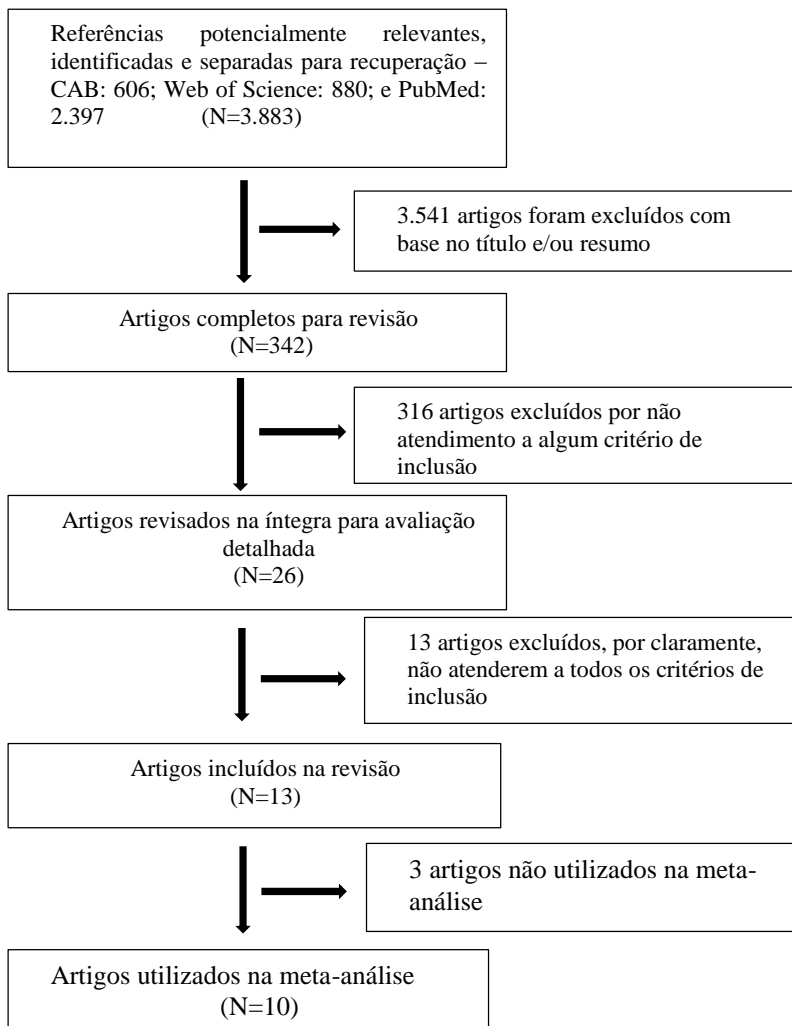
WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review Entomology**, v. 41, p. 1-22, 1996.

WIKEL, S, K. et al. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, v.13: p.383–389, 1997.

World Health Organization. Technical Report Series. n. 296, pp. 29, 1965.

ZEPP, F. Principles of vaccine design – lessons from nature. **Vaccine**, v.28 (Suppl.3), p.C14–C24, 2010.

ZIVKOVIC, Z. et al. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. **Immunology**, v.11, n.7, 2010.

APÊNDICE A - Fluxograma de publicações identificadas e incluídas durante o processo de revisão de literatura

APÊNDICE B - Artigos/estudos excluídos após leitura integral e detalhada do texto.

Autor	Título	Motivo da exclusão
MERINO et al. (2011)	Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by <i>Anaplasma marginale</i> and <i>Babesia bigemina</i>	Apenas caracteriza o efeito da subolesina
PRUDENCIO et al. (2010)	Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Testou apenas produção de anticorpos sem análise de efeito sobre carrapato
CANALES et al. (1997)	Large-scale production in <i>Pichia pastoris</i> of the recombinant vaccine Gavac® against cattle tick	Focou caracterização antigênica apenas
PENICHET et al. (1994)	Detection of Bm86 antigen in different strains of <i>Boophilus microplus</i> and effectiveness of immunization with recombinant Bm86	Não foi possível identificar se foram animais de laboratório, não informou se realizou randomização.
MASSARD et al. (1995)	Evaluation of the efficacy of a recombinant rBm86 vaccine, "GAVAC", against the tick <i>Boophilus microplus</i> in Brazil.	Não informou grau de sangue dos animais, número de animais por grupo e nem se foi ensaio randomizado
CANALES et al. (2009)	Vaccination with recombinant <i>Boophilus annulatus</i> Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against <i>B. annulatus</i> and <i>B. microplus</i> infestations	Não informou o grau de sangue dos animais
VAZ JR. et al. (1998)	Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from <i>Boophilus microplus</i> eggs	Não houve clareza da estirpe testada e não informou se foi ensaio randomizado
GARCÍA-GARCÍA et al. (1998)	Effect of participation on the immunogenic and protective	Não informou idade dos animais

continuação

	properties of the recombinant Bm86 antigen expressed in <i>Pichia pastoris</i>	
PARIZI et al. (2011)	Cross immunity with <i>Haemaphysalis longicornis</i> glutathione S-transferase reduces an experimental <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i> infestation	Não informou idade e nem se o ensaio foi randomizado
ANDREOTTI (2006)	Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test	Não informou o grau de sangue dos animais, apenas que eram híbridos
MERINO et al. (2013)	Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection	Não informou o grau de sangue
SEIXAS et al. (2008)	Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE)	Não informou se o ensaio foi randomizado
LEAL et al. (2006)	Vaccination of bovines with recombinant <i>Boophilus</i> Yolk pro-Cathepsin	Não informou se o ensaio foi randomizado

APÊNDICE C - Artigos de revisão não sistemática como estratégia de inclusão de novos artigos, porém não incluídos.

Autor	Título	Motivo da exclusão
CUNHA, R. C. et al. (2013)	Calculation of the efficacy of vaccines against tick infestations on cattle	Não foi possível elencar e/ou recuperar estudos dessas revisões
DE LA FUENTE et al. (2000)	Immunological control of ticks through vaccination with <i>Boophilus microplus</i> gut antigens	
DE LA FUENTE et al. (1999)	Vaccination against ticks (<i>Boophilus</i> spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac TM	
GARCIA-GARCIA et al. (1999)	Sequence variations in the <i>Boophilus microplus</i> Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen	
DE LA FUENTE E KOCAN (2003)	Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations	
ADRIANA SEIXAS et al. (2012)	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i> embryo proteins as target for tick vaccine	
PARIZI et al. (2012)	Multi-antigenic vaccine against the cattle tick <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i> : A field evaluation	

continuação

conclusão

IMAMURA et al. (2007)	Recent topics of candidate antigens for immunological control of ixodid ticks	
GUERRERO et al. (2012)	Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?	
MERINO et al. (2013)	Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens	
VAZ JÚNIOR et al. (2004)	Caracterização de novos antígenos em <i>boophilus microplus</i>	
PARIZI, et al. (2009)	New approaches toward anti- <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i> tick vaccine	